

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**Determinantes genéticos de la
senescencia celular
como mecanismo de acción antitumoral**

MEMORIA PRESENTADA POR
MARÍA ESTRELLA CASTRO DEL FRESNO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Grupo de Desarrollo de Ensayos, Departamento de Terapias Experimentales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, bajo la dirección del **Dr. Amancio Carnero Moya**.

Ha sido realizado con una beca de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia.

A LOS QUE SUFREN POR EL CÁNCER

AGRADECIMIENTOS

Creo que todos los que hemos intentado poner nuestro granito de arena en la investigación del cáncer hemos experimentado alguna vez la frustración de que ese granito no fuera tan grande como nos hubiera gustado.

Porque la andadura por la tesis no ha sido precisamente fácil, quiero dar las gracias a todos lo que me han ayudado en el camino.

En primer lugar, agradezco a Amancio Carnero, mi director de tesis, su confianza en mí y su actitud comprensiva.

Doy las gracias también a María y Juanfe por haberme querido siempre, incluso cuando menos lo merecía, que era justo cuando más lo necesitaba. He aprendido mucho de vosotros.

Gracias a Carmen por haber sido siempre un ejemplo de mujer capaz y trabajadora.

Irene, Arantxa y Fábian: gracias por haberme dejado compartir con vosotros mis risas y mis lágrimas.

En definitiva, gracias a todos mis compañeros del laboratorio, porque todos me habéis brindado vuestra ayuda en un momento u otro y además habéis tenido el enorme mérito de aguantar mis altibajos anímicos.

También agradezco a mi familia y amigos que, incluso en la distancia, hayan vivido conmigo mis pequeños logros y mis desilusiones, y que me hayan apoyado siempre. Por último, quiero dar las gracias a Juan Luis, por estar siempre a mi lado.

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	11
3.1. CÁNCER.	13
3.1.1. Oncogenes.	13
3.1.2. Genes supresores de tumores.	14
3.1.3. Genes de estabilidad.	14
3.1.4. Carcinogénesis.	15
3.2. LAS VÍAS DE RETINOBLASTOMA Y DE p53 EN CÁNCER.	16
3.3. SENESCENCIA CELULAR.	22
3.3.1. Senescencia inducida por oncogenes.	24
3.3.2. Senescencia celular como mecanismo de acción antitumoral.	25
3.4. MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS NO PROTEICAS CON RELEVANCIA EN CÁNCER.	27
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1. REACTIVOS BIOLÓGICOS USADOS.	35
5.2. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	35
5.2.1. Generación de bacterias súper-electrocompetentes.	35
5.2.2. Transformación de células electrocompetentes (electroporación).	36
5.2.3. Transformación de células quimiocompetentes.	37
5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	37
5.2.5. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa.	37
5.2.6. Clonaje de productos de PCR.	38
5.2.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción.	38
5.2.8. Ligación.	38
5.2.9. Extracción de DNA plasmídico.	39
5.3. CULTIVOS CELULARES.	40
5.3.1. Líneas celulares.	40
5.3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.	40
5.3.3. Transfección por precipitación con fosfato cálcico.	41
5.3.4. Aislamiento de clones celulares.	41
5.3.5. Infección retroviral.	42
5.3.6. Generación de la librería de fragmentos antisentido de ratón y transducción de MEFs p53 ^{-/-} ; p21 ^{-/-} ; p53 ^{ts} ; ras.	42
5.3.7. Recuperación <i>in vitro</i> de los provirus.	43
5.4. ENSAYOS CELULARES.	43
5.4.1. Actividad β-gal asociada a senescencia.	43
5.4.2. Curvas de crecimiento.	44
5.4.3. Ensayo clonogénico.	44
5.4.4. Cambios de temperatura y análisis de la capacidad formadora de colonias.	44
5.4.5. Tratamiento de células NIH3T3 con doxorrubicina y H ₂ O ₂ .	44

5.4.6. Sobreexpresión de las diferentes variantes de procesamiento alternativo de <i>ppp1ca</i> y valoración de la formación de colonias.	45
5.4.7. Ensayo de niveles intracelulares de ceramidas mediante cromatografía en capa fina (TLC)	45
5.4.8. Adición de ceramida exógena.	46
5.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE ARN.	47
5.5.1. Extracción de ARN total.	47
5.5.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	47
5.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (Q/RT-PCR).	48
5.5.4. Northern blot.	49
5.5.5. Hibridación de matrices de cDNA.	50
5.6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA.	51
5.6.1. Anticuerpos.	51
5.6.2. Extracción de proteína total.	52
5.6.3. Western blot.	52
5.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL POR MEDICIÓN DE LUCIFERASA DUAL.	53
RESULTADOS	57
6.1. GENERACIÓN DE FIBROBLASTOS DIANA DONDE REALIZAR EL RASTREO GENÉTICO.	59
6.2. RASTREO GENÉTICO.	64
6.2.1. Resultados primarios del rastreo genético.	66
6.2.2. Verificación secundaria del efecto de los fragmentos antisentido.	67
6.2.3. Análisis del tamaño y localización de los fragmentos antisentido positivos.	68
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE UN GRUPO DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES Y p53.	70
6.3.1. Los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales reducen la actividad transcripcional de p53.	71
6.3.2. Los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales reducen los niveles de p53.	73
6.3.3. Las proteínas ribosomales como supresores tumorales.	74
6.4. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE p53 Y LOS SIGUIENTES GENES: <i>SLK</i>, <i>CINP</i>, <i>ATX</i>, <i>BRCA1</i> Y <i>MYBBP1A</i>.	76
6.4.1. Efecto sobre la actividad transcripcional de p53.	78
6.4.2. Respuesta tras daño en el DNA inducido por doxorubicina.	79
6.4.3. Expresión dependiente de p53.	81
6.4.4. Estos genes como supresores tumorales.	81
6.5. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE PPP1CA, p53 Y RAS.	85
6.5.1. El ARN de interferencia creado contra <i>ppp1ca</i> evadía la parada del crecimiento inducida por Ras y p53.	85
6.5.2. La proteína de Ppp1ca aumentaba de forma dependiente de Ras y se estabilizaba por p53.	86
6.5.3. Respuesta tras daño en el DNA.	87
6.5.4. El ARN de interferencia contra <i>ppp1ca</i> puede cambiar el estado de fosforilación de pRb.	88
6.5.5. El oncogén <i>ras</i> aumenta los niveles endógenos de ceramidas.	89
6.5.6. El ARN de interferencia de <i>ppp1ca</i> evadía parcialmente la senescencia inducida por ceramidas exógenas en los MEFs p53 ^{-/-} ;ts.	90
6.5.7. <i>Ppp1ca</i> como supresor tumoral.	92

6.5.8. La sobreexpresión de <i>ppp1ca</i> reduce parcialmente el crecimiento de colonias en HCT-116 p53 ^{-/-} y SAOS 2.	93
DISCUSIÓN	97
7.1. JUSTIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES DEL RASTREO GENÉTICO.	99
7.2. RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES Y p53.	100
7.3. RELACIÓN ENTRE SLK, CINP, ATX, BRCA1, MYBBP1A Y p53.	103
7.4. RELACIÓN ENTRE PPP1CA, p53, RAS Y CERAMIDAS.	105
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFÍA	115

RESUMEN

1. SUMMARY

Cellular senescence has been proposed to be a tumor suppressor mechanism, acting in parallel to apoptosis. Most of the tumors show some deregulation in these processes, thus bypassing the natural defences of normal cells towards cancerous transformation. Basic knowledge about these processes could be useful in cancer treatment.

We have performed a genome-wide screen to identify genes whose loss of function would be involved in the bypass of Ras-p53-induced cellular senescence. Amongst the antisenses identified, there are genes of known function, genes of unknown function, and a third group of fragments not identified in the database. The identification of *p53* itself represents a strong validation of our genetic screening. 75% of fragments were smaller than 160 nucleotides, coincident with the size previously described to be the most effective for gene silencing. The analysis of the antisense distribution along the different mRNA transcripts showed that antisenses distributed along the entire transcripts, including the 5' and 3' non-coding sequences, being specially abundant in the latter.

Amongst the identified fragments, we found a group of 14 ribosomal proteins whose loss of function bypassed p53-induced cell-cycle arrest. We have observed that the expression of antisense fragments against these ribosomal proteins reduced the transcriptional activity of p53. Our data suggest that their effect is mediated through the control of p53 mRNA translation. We propose that a decrease in the normal ribosomal biogenesis would be sensed as a stress, activating a checkpoint connected to p53. In our work, a small percentage of tumors showed a 50% reduction in the mRNA levels of some specific ribosomal proteins. We propose that the ribosomal proteins identified could behave as haploinsufficient tumor suppressors.

Besides, we have tried to clarify the relationship between p53 and other five proteins identified in our genetic screening: SLK, CINP, ATX, BRCA1 and MYBBP1A. The expression of antisense fragments against *slk*, *atx* and *brca1* reduced the transcriptional activity of p53. Besides, *atx*, *brca1* and *mybbp1a*, seem to be modulated by p53. The lack of expression of some of these genes in tumoral cell lines and tumors supports the hypothesis that they can act as tumor suppressors.

Finally, we have characterized more exhaustively another gene identified in our genome-wide screen: *ppp1ca*. It is the catalytic subunit of protein phosphatase 1, alpha isoform. A reduction in Ppp1ca protein level would lead to a defect in pRb dephosphorylation, rendering this protein hyperphosphorylated, even when p53 is induced, thus allowing cellular growth. Just on the contrary, *ppp1ca* overexpression was able to reduce the growth of colonies in human tumor cell lines. Oncogenic Ras promotes an increase in the intracellular levels of ceramides in our system and we also observe a Ras-dependent increase in Ppp1ca protein level. Ceramide modulates a number of biochemical and cellular responses, including cell-cycle arrest and apoptosis. In fact, adding exogenous C₆-ceramide we were able to induce a senescent phenotype in our cellular model. Nevertheless, we managed to reduce ceramide-induced senescent cells through silencing *ppp1ca* by shRNA. We propose that *ras* oncogene could act as a stress agent, causing endogenous ceramides accumulation during senescence, and that these molecules are important regulatory players in this process, acting through Ppp1ca. Significant reduction of *ppp1ca* expression in some lung tumors would also favour the idea of this gene behaving as a tumor suppressor.

RESUMEN

La senescencia celular ha sido propuesta como un mecanismo supresor tumoral paralelo a la apoptosis. La mayoría de los tumores exhiben una desregulación de estos procesos, logrando así evadir las defensas naturales que poseen las células normales contra la transformación tumoral. El conocimiento básico sobre estos procesos podría ser útil en el tratamiento del cáncer.

Hemos llevado a cabo un rastreo genético, extendido a todo el genoma, para identificar genes cuya ausencia de función estuviera implicada en la anulación de la senescencia celular inducida por *p53* y el oncogén *ras*. Entre los fragmentos antisentido identificados se encuentran genes de función conocida, genes de función desconocida y otros fragmentos no identificados en las bases de datos. La obtención de varios fragmentos antisentido contra *p53* en nuestro rastreo representa una validación contundente del método empleado. El 75% de los fragmentos eran menores de 160 nucleótidos, coincidiendo con el tamaño descrito previamente como el más efectivo en el silenciamiento génico. El análisis de la distribución de los diferentes fragmentos demostró que los mismos se ubicaban no sólo en la zona codificante, sino también en las zonas 5' y 3' no codificantes, siendo especialmente abundantes en esta última.

Entre los fragmentos identificados se encontraba un grupo de 14 proteínas ribosomales cuya pérdida de función evitaba la parada de crecimiento inducida por *p53*. Hemos visto que la expresión de los fragmentos antisentido contra esas proteínas ribosomales reducía la actividad transcripcional de *p53* y nuestros datos sugieren que su efecto está mediado a través del control específico de la traducción del ARNm de *p53*. Proponemos que una disminución en la biogénesis ribosomal se interpretaría como un tipo de estrés, activando un punto de control conectado con *p53*. En nuestro trabajo, un pequeño porcentaje de tumores mostraba una reducción del 50% en los niveles de ARNm de algunas proteínas ribosomales específicas. Proponemos que las proteínas ribosomales identificadas podrían ejercer un papel como supresores tumorales en haploinsuficiencia.

Hemos completado nuestro trabajo eligiendo fragmentos antisentido contra 6 genes distintos y estudiando la relación de estos genes con *p53* y con el proceso de senescencia. *Slk*, *cinp*, *atx*, *brcaa1* y *mybbp1a* están perdidos con frecuencias variables en líneas celulares tumorales y tumores humanos. La expresión de los

fragmentos antisentido contra *slk*, *atx* y *brcaa1* reducía la actividad transcripcional de p53. Además, *atx*, *brcaa1* y *mybbp1a* parecen estar modulados transcripcionalmente por p53.

Por último, nos hemos detenido en la caracterización más exhaustiva de otro gen identificado en nuestro rastreo genético a gran escala: *ppp1ca*. Se trata de la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa. La reducción en los niveles de Ppp1ca origina un defecto en la desfosforilación de pRb, manteniendo a esta proteína hiperfosforilada incluso en condiciones de activación de p53, permitiendo así el crecimiento celular. Al contrario, la sobreexpresión de *ppp1ca* era capaz de reducir el crecimiento en líneas tumorales humanas. Hemos visto que el oncogén *ras* promueve un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas en nuestro sistema, así como un aumento del nivel de la proteína Ppp1ca. Las ceramidas tienen un papel importante como moléculas señalizadoras en procesos como la parada del ciclo celular o la apoptosis. De hecho, con la adición de ceramida exógena C₆ fuimos capaces de inducir un fenotipo senescente en nuestro modelo celular. Sin embargo, con el silenciamiento de *ppp1ca* mediante shRNA conseguíamos disminuir el número de células senescentes inducidas por ceramida exógena. Proponemos que el oncogén *ras* podría ser uno de los agentes de estrés que causan la acumulación de ceramidas endógenas en las células durante senescencia y que éstas son un importante elemento regulador a través de Ppp1ca. La reducción significativa de la expresión de *ppp1ca* en algunos casos de tumores de pulmón también apoyaría la idea de que este gen pudiera actuar como supresor tumoral.

ABREVIATURAS

2. ABREVIATURAS

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

CAPPS: proteínas fosfatasa activadas por ceramidas

CDKs: quinasas dependientes de ciclina

cDNA: DNA complementario

cps: cuentas por segundo

DDR: respuesta a daño en el DNA

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

FBS: suero fetal bovino

GFP: proteína verde fluorescente

ITS: suplemento de los medios de cultivo celulares que contiene insulina, transferrina y selenito sódico

LB: medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani

MEFs: fibroblastos embrionarios murinos

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PNUTS: subunidad que dirige a la proteína fosfatasa 1 al núcleo

PP1: proteína fosfatasa 1

PP1c: subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1

PP1 α : heterodímero compuesto por la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa (PPP1CA) y una subunidad reguladora

PP2A: proteína fosfatasa 2A

PPP1CA: subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa

pRS: vector retroviral pRetroSuper

Q-RT/PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

Rb: retinoblastoma

rpm: revoluciones por minuto

RP: proteínas ribosomales

RS: especies reactivas

RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

SAHF: foci de heterocromatina asociados a senescencia

SDS: dodecil sulfato sódico

shRNA: horquilla corta de ARN, complementaria a ARNm

TLC: cromatografía en capa fina

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. CÁNCER.

El cáncer es una enfermedad genética compleja, caracterizada por la proliferación incontrolada de un grupo determinado de células del organismo.

Aunque existen variaciones entre los distintos tipos de cáncer, e incluso entre los diferentes pacientes que padecen un mismo tipo, la creencia de que bajo la mayoría de estos síndromes subyacen alteraciones esenciales comunes está bastante aceptada entre la comunidad científica. Mediante la desregulación de tres tipos de genes: **oncogenes**, **genes supresores de tumores** y **genes de estabilidad** (Vogelstein y Kinzler, 2004), la célula cancerosa adquiriría las siguientes capacidades tumorales (Hanahan y Weinberg, 2000):

1. Autosuficiencia en cuanto a señales de crecimiento.
2. Insensibilidad frente a señales inhibitoras del crecimiento.
3. Evasión de la muerte celular programada (apoptosis).
4. Potencial replicativo ilimitado.
5. Aumento de la angiogénesis.
6. Invasión de tejidos y metástasis.

3.1.1. Oncogenes.

Estos genes contribuyen al cáncer cuando sufren una ganancia de función que los mantiene activos en condiciones en las que el gen normal no lo estaría (Scarpelli, 1983). Los proto-oncogenes (genes celulares que aún no han sido activados oncogénicamente) pueden codificar para factores de crecimiento, receptores de la superficie celular, proteínas transductoras, proteínas de señalización intracelulares o factores de transcripción (Lynch, 1987). La activación oncogénica puede provenir de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones intragénicas que afecten a residuos que regulen la actividad de la proteína codificada por dicho gen. Una única mutación somática activadora en un alelo de un oncogén es generalmente suficiente para conferir ventaja selectiva para el crecimiento de la célula.

3.1.2. Genes supresores de tumores.

Este segundo tipo de genes contribuye al fenotipo tumoral como consecuencia de su pérdida de función, ya sea por mutaciones inactivadoras, deleciones o inserciones, o por silenciamiento epigenético. Es decir, justo al contrario de lo que ocurre con los oncogenes, la mayor predisposición a desarrollar cáncer en el caso de los genes supresores tumorales se debe a alteraciones que reducen la actividad de las proteínas codificadas por ellos y que están implicadas en procesos tales como el control del ciclo celular, la muerte celular, la transducción de señales, la angiogénesis o el desarrollo (Sager, 1989). En general, se requieren mutaciones en ambos alelos de un gen supresor tumoral para conferir una ventaja selectiva a la célula cancerosa. Sin embargo, también se ha comprobado que, en ciertos casos, la disminución en la cantidad de proteína ocasionada por la pérdida de un único alelo (hemicigosidad) de un gen supresor tumoral, ya constituye un factor de riesgo para el fenotipo canceroso (Lynch y Milner, 2006; Santarosa y Ashworth, 2004).

Tanto las alteraciones en oncogenes como en genes supresores tumorales provocan el mismo resultado: producen una ventaja selectiva en la supervivencia y/o proliferación de las células que las poseen.

3.1.3. Genes de estabilidad.

Esta tercera clase de genes promueven la tumorigénesis cuando están mutados, al permitir que ocurran mutaciones en el genoma. Dentro de este grupo de genes están los encargados de reparar los pequeños errores que ocurren durante la replicación normal del DNA o durante la exposición a mutágenos. Otros genes de estabilidad controlan procesos como la recombinación mitótica y la segregación cromosómica, que son procesos que implican grandes porciones de los cromosomas. Los genes de estabilidad mantienen las alteraciones genéticas al mínimo y cuando ellos están inactivados las mutaciones en los demás genes ocurren a una tasa mayor (Friedberg, 2003). Aunque todos los genes del organismo son susceptibles de sufrir mutaciones, sólo las mutaciones en oncogenes o genes supresores tumorales confieren una ventaja selectiva para el crecimiento de la célula mutada.

En la Tabla 1, se muestran ejemplos de genes pertenecientes a cada uno de los tres tipos de genes antes reseñados.

Gen	Función principal	Cánceres en los que aparece mutado
Genes supresores tumorales		
APC	Transducción de señales	Colon, tiroides, estómago, intestino
VHL	Unión a factores de transcripción	Riñón
TP53	Factor de transcripción	Mama, sarcoma, adrenal, cerebro...
PTEN	Fosfatasa de lípidos	Hamartoma, glioma, útero
CDKN2 (p16 ^{INK4A})	Inhibición de CDKs	Melanoma, páncreas
RB1	Regulación del ciclo celular	Retinoblastoma y muchos otros
NF1	Regulación de la transducción de señales	Neurofibroma
MEN1	Regulación de la transcripción	Paratiroides, pituitaria...
BAX	Activación de la apoptosis	Colon, estómago
Genes de estabilidad		
ATM	Serina/Treonina quinasa	Leucemias, linfomas, cerebro
BRCA1, BRCA2	Mantenimiento de estabilidad genómica	Mama, ovario
XPA	Unión a DNA dañado	Piel
Oncogenes		
KIT	Tirosina quinasa	Tumores gastrointestinales de estroma
MDM2	Regulador transcripcional/ Ubiquitina-ligasa	Sarcomas
AKT2	Serina/Treonina quinasa	Ovario, mama
PI3K	Quinasa de fosfolípidos	Colon, estómago, cerebro, mama
CCND1 (ciclina D1)	Regulación del ciclo celular	Leucemias, mama
BRAF	Tirosina quinasa	Melanoma, colorrectal, tiroides
KRAS2, N-RAS	GTPasa	Colorrectal, pancreático, NSCLC

Tabla 1: Ejemplos de genes desregulados en cáncer humano. Se muestran ejemplos de genes supresores tumorales, genes de estabilidad y oncogenes, recalando su principal función biológica, así como ejemplos de cánceres en los que aparecen mutados. NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

3.1.4. Carcinogénesis.

Las mutaciones en estos tres tipos de genes pueden ocurrir tanto en la línea germinal, provocando una predisposición hereditaria a padecer cáncer, como en células somáticas aisladas, originando tumores esporádicos (Vogelstein y Kinzler, 2004).

Por mutación entendemos cualquier cambio en la secuencia de bases del genoma. Estos cambios incluyen tanto a aquellos que afectan solamente a un nucleótido como a los que implican pequeñas o grandes deleciones o inserciones, amplificaciones o translocaciones. Sin embargo, hay alteraciones epigenéticas que producen alteraciones genéticas sin mutaciones en la secuencia genómica.

Se requieren varias alteraciones genéticas para que la célula cancerosa adquiera las propiedades tumorales arriba citadas y sea efectiva la progresión tumoral (Nowell, 2002).

El mecanismo de la carcinogénesis en humanos es, a menudo, multifactorial y complejo. Intervendría un componente ambiental (carcinógenos exógenos químicos, físicos y biológicos), también intervendrían carcinógenos generados endógenamente como consecuencia del metabolismo normal y, por último, influiría el componente genético (cada persona, debido a su constitución genética, puede ser más o menos sensible a las mutaciones causadas por dichos carcinógenos) (Migliore y Coppede, 2002).

3.2. LAS VÍAS DE RETINOBLASTOMA Y DE p53 EN CÁNCER.

Existen vías de señalización muy importantes en la prevención de la adquisición de esas capacidades tumorales por la célula normal. Estas vías aparecen desreguladas en la mayoría de los cánceres humanos, ya que su inactivación confiere una ventaja selectiva para la célula tumoral.

Así, encontramos que la desregulación de la vía de retinoblastoma (*rb1*) puede ser esencial para la formación de células cancerosas (Hahn y Weinberg, 2002; Sherr y McCormick, 2002). La vía de señalización gobernada por la proteína de Rb (pRb) juega un papel fundamental en el control del ciclo celular (Figura 1). La función de pRb en el control de la transición G1/S está regulada por fosforilación y desfosforilación en residuos de serina y treonina. pRb controla la transición desde la fase G1 a la S uniéndose a las proteínas E2F1, E2F2, o E2F3 y por lo tanto, reprimiendo los promotores de genes necesarios para la entrada en la fase S. Esta represión se acaba cuando pRb se hiperfosforila hacia el final de la fase G1 (Nevins et al., 1997). Al menos son necesarias dos fosforilaciones sucesivas. Normalmente la primera fosforilación es llevada a cabo por una holoenzima CDK4/Ciclina D, y la siguiente fosforilación es llevada a cabo por la holoenzima CDK2/Ciclina E. Tras la mitosis, pRb es parcialmente desfosforilado y así se restablece su estado hipofosforilado y su función represora. Se ha descrito que la proteína fosfatasa 1 (PP1) es la fosfatasa encargada de llevar a cabo la desfosforilación de pRb en respuesta a señales inhibitorias del crecimiento (Nelson et al., 1997). La forma hipofosforilada de pRb inhibe la proliferación celular (Chen et al., 1989).

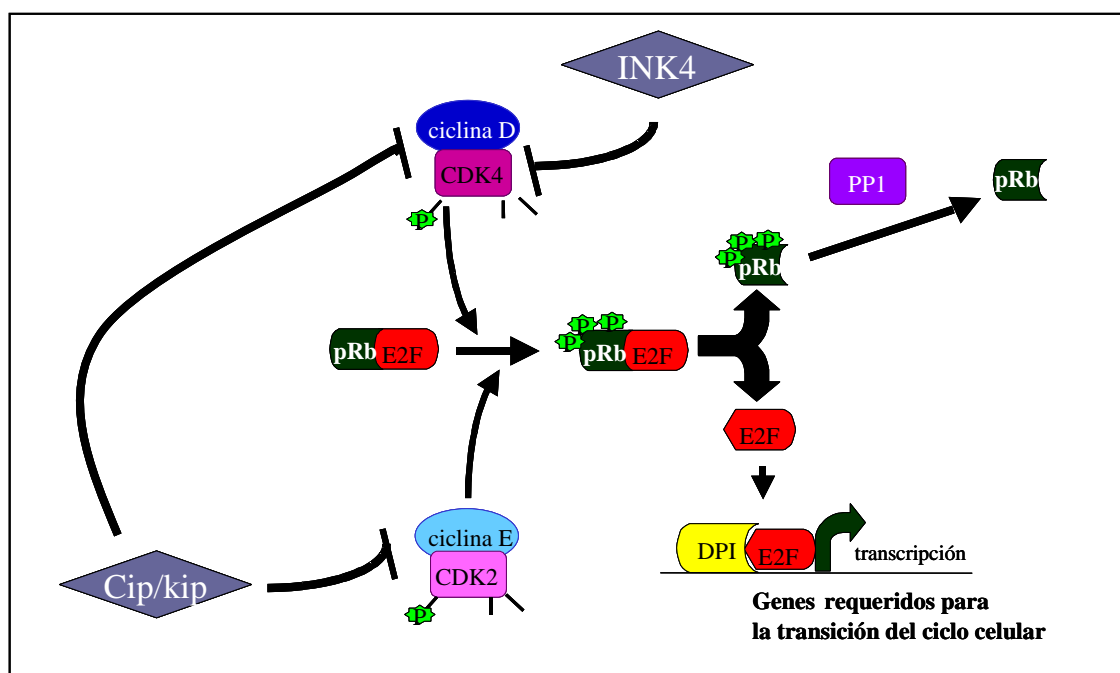


Figura 1: Vía de retinoblastoma. El control de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular es llevado a cabo por la fosforilación secuencial de pRb por los complejos CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E. pRb hiperfosforilado libera a E2F, que ya puede dirigir la transcripción de genes requeridos para la progresión del ciclo celular. INK4 y Cip/kip son las dos familias de inhibidores de CDKs. PP1 es la fosfatasa encargada de desfosforilar a pRb.

El mecanismo de regulación del ciclo celular, incluso centrándonos exclusivamente en la transición G1/S, es muy complejo. Así, la actividad de las proteínas quinasas CDK4 y CDK2 depende estrictamente de la presencia de sus subunidades reguladoras; es decir, de las ciclinas D y E respectivamente. Es más, las CDKs sólo son activas cuando exhiben cierto patrón de fosforilación. Otro nivel de control adicional lo proporcionan las proteínas inhibidoras de CDKs. Existen dos clases de estos inhibidores: la familia CIP/KIP y la familia INK4 (Malumbres y Carnero, 2003). Las proteínas INK4 ($p15^{INK4B}$, $p16^{INK4A}$, $p18^{INK4C}$ y $p19^{INK4D}$) compiten por unirse a CDK4 y bloquean su actividad quínasa. Las proteínas de la familia CIP/KIP ($p21^{CIP1}$ - de aquí en adelante denominada simplemente p21-, $p27^{KIP1}$ y $p57^{KIP2}$), a altas concentraciones, inhiben la actividad de las CDKs en general, bloqueando las holoenzimas CDK-Ciclina. Los diferentes inhibidores de CDKs actúan en respuesta a diferentes señales que conducen a la detención del ciclo celular.

Por otro lado, también existe una fina regulación de la proteína fosfatasa encargada de desfosforilar a pRb. Así, la subunidad catalítica de la fosfatasa PP1

está controlada por la unión a ciertas subunidades reguladoras (Rubin et al., 1998), y además sufre fosforilación inhibitoria por las propias CDKs (Liu et al., 1999).

La pérdida de la función del gen *retinoblastoma* perturba la regulación del ciclo celular y puede desembocar en una proliferación celular incontrolada y una disminución de la dependencia de señales extracelulares. pRb se requiere tanto para la activación eficiente del punto de control entre las fases G1 y S del ciclo celular, en respuesta al daño en el DNA (Harrington et al., 1998) como para mantener el estado de salida del ciclo celular en células quiescentes y senescentes (Sage et al., 2003). No obstante, parece que la función de pRb es considerablemente más compleja que lo que se había asumido hasta ahora. De esta forma, pRb parece estar implicado en muchos procesos celulares fundamentales, incluyendo el ciclo de división, las respuestas al estrés, la diferenciación, la senescencia y la muerte celular programada, entre otros. La proteína codificada por *retinoblastoma* está implicada en estos procesos interaccionando con una plétora de proteínas (Goodrich, 2006).

Además de la pérdida de la función del propio *retinoblastoma*, otros componentes de su red reguladora pueden verse afectados en los diferentes tipos de cáncer humano (Sherr y McCormick, 2002). Como ejemplos representativos podríamos citar la sobreexpresión de *ciclina D*; las mutaciones de *cdk4* que lo hacen insensible a los inhibidores de CDKs; o la inactivación de *p16^{INK4A}* por mutación puntual, hipermetilación de su promotor o delección homocigótica.

Otra vía fundamental es la vía de p53. El supresor tumoral *p53* es el gen que aparece más frecuentemente mutado en tumores humanos. Aproximadamente el 50% de los tumores poseen mutaciones en este gen (Hollstein et al., 1994). Si además consideramos globalmente las mutaciones que desregulan esta vía, la mayoría de los tumores entrarían en esta categoría.

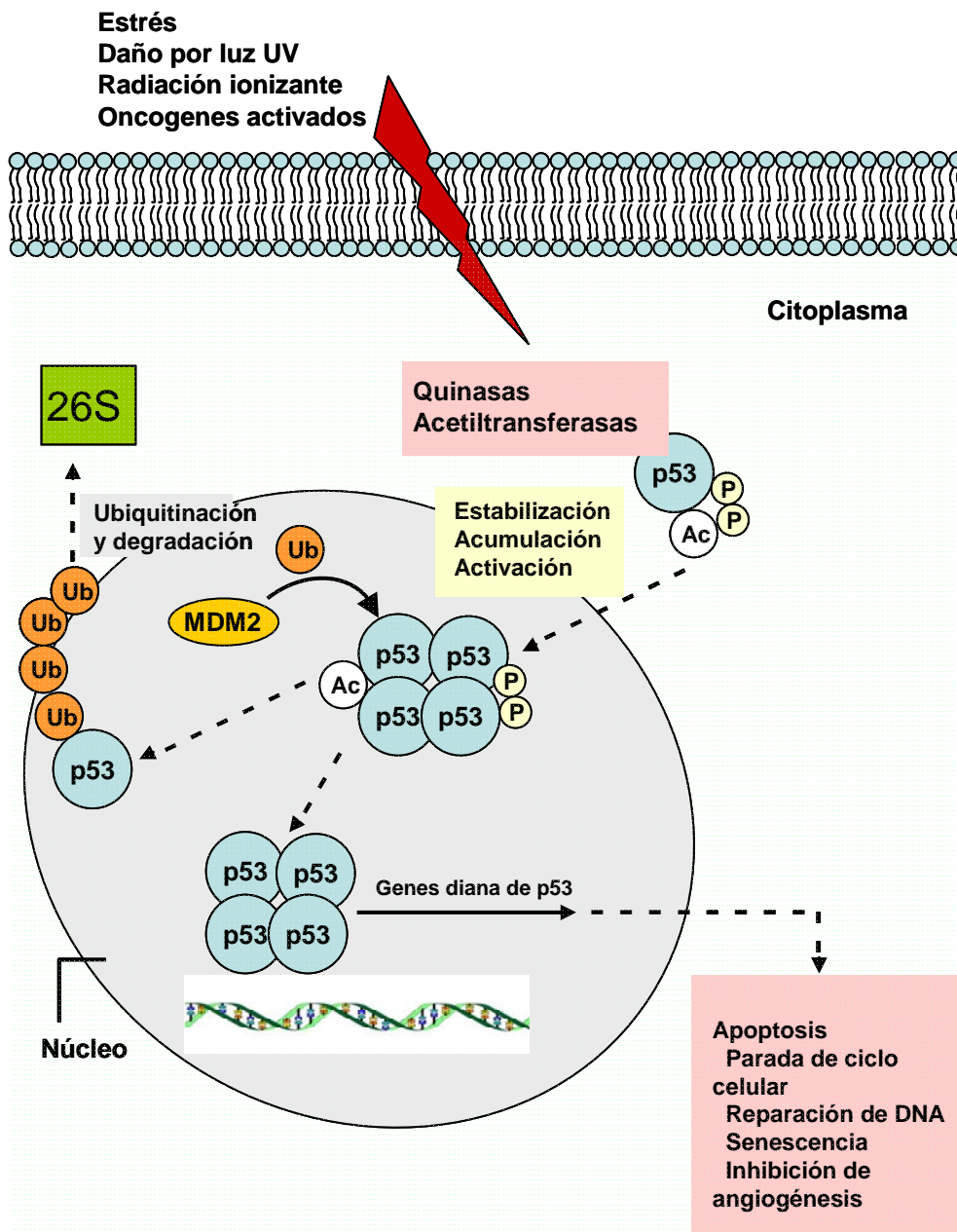


Figura 2: Activación de p53 y respuesta celular. Las señales de estrés convergen en p53 y activan varias proteínas quinasas y/o acetiltransferasas, que fosforilan o acetilan a p53, respectivamente. Estas modificaciones postraduccionales generalmente resultan en la estabilización y activación de p53 en el núcleo, donde p53, en su forma tetramérica, interacciona con secuencias específicas de sus genes diana. La activación transcripcional origina diversas respuestas celulares, tales como parada de ciclo celular, reparación de DNA, senescencia o apoptosis. Cuando p53 no se necesita más, se marca mediante ubiquitinación por Mdm2, para ser degradado por el proteosoma 26S. Dibujo adaptado del original de (Bode y Dong, 2004).

La proteína p53 ejerce su función antitumoral principalmente a través de tres actividades biológicas: parada de ciclo celular (Steinmeyer et al., 1990), inducción de apoptosis (Yonish-Rouach et al., 1991) e inducción de senescencia (Serrano et al., 1997). No obstante, también se ha demostrado que su actividad como supresor

tumoral alcanza otros procesos, como la inhibición de la angiogénesis (Folkman, 2006). p53 es un factor de transcripción que integra muchas señales celulares de estrés tales como daño en el DNA, hipoxia o activación oncogénica (Jacks y Weinberg, 1996). Esas señales inducen la estabilización de p53, que normalmente es una proteína poco abundante y de vida media muy corta (Levine, 1997) y como consecuencia se produce p53 activo, adoptando una estructura cuaternaria tetramérica (Jeffrey et al., 1995; Levine, 1997). (Figura 2). Entre los genes transactivados por p53 podemos destacar a *p21Cip1* (que regula los puntos de control G1/S y G2/M del ciclo celular), *14-3-3 σ* (que regula el punto de control G2/M del ciclo celular), *gadd45* (importante para la reparación del DNA), *bax* (que activa el programa de apoptosis celular) o *mdm2* (que participa con p53 en un bucle de regulación negativa, controlando la actividad, estabilidad y localización subcelular de p53)(el-Deiry, 1998). El resultado de la actividad de p53 puede ser tanto parada reversible del ciclo celular como retirada permanente del ciclo celular seguida de la inducción de apoptosis o senescencia celular (Ferbeyre et al., 2002; Lowe y Ruley, 1993; Serrano et al., 1997).

La actividad supresora de p53 está controlada de múltiples formas y este control es necesario para la ocurrencia normal de muchos procesos fisiológicos como la supervivencia celular bajo condiciones normales o el desarrollo embrionario. Juega un papel fundamental en este escenario la oncoproteína Mdm2, que ya hemos señalado que establece un bucle de regulación negativa con p53, sólo interrumpido cuando la actividad de p53 es necesaria o cuando Mdm2 está desregulada. Hasta el 10% de los tumores humanos, muestran sobreexpresión de *mdm2* (Ganguli y Wasylyk, 2003); en otros, p53 no se estabiliza o activa. En todos esos tumores, la perturbación del bucle de regulación negativa entre p53 y Mdm2 sería suficiente para generar p53 estable y activo, y por lo tanto, dirigir a las células tumorales a una parada del ciclo celular, senescencia o apoptosis. Este bucle de regulación negativa puede dividirse en varios pasos secuenciales perfectamente compartimentalizados, siendo cada uno de ellos de capital importancia para el resultado final del proceso. Estos pasos son: la transactivación del gen *mdm2* por p53, la localización nuclear de Mdm2 debido a la fosforilación por Akt, la unión entre Mdm2 y p53, la ubiquitinación de p53 por la actividad ligasa E3 de Mdm2, la exportación nuclear del p53 ubiquitinado y la degradación en el proteosoma de ese

p53 ubiquitinado. En esta vía pueden incluirse otros mecanismos reguladores, tales como la unión Mdm2-p19/p14^{ARF} que concluye con el secuestro en el nucleolo de Mdm2 o como la modificación de p53 (principalmente por fosforilación) tras el estrés celular, para evitar su interacción con Mdm2 y, por tanto, su degradación.

La proteína p53 actúa como un factor de transcripción. Se une a una secuencia específica presente en el promotor de un grupo de genes finamente regulados y activa su transcripción. Entre estos genes, la expresión de *mdm2* está considerablemente inducida tras la activación de p53. También la cantidad de la proteína Mdm2 aumenta pocas horas después de la activación de p53. Para ejercer su función reguladora, Mdm2 debe translocarse al núcleo. La serina/treonina quinasa Akt, una proteína que juega un papel central en el proceso de la carcinogénesis (Testa y Bellacosa, 2001), fosforila a Mdm2 en las serinas 166 y 186 tras su activación por señales de supervivencia (Gottlieb et al., 2002; Mayo y Donner, 2001; Zhou et al., 2001). Estas serinas se encuentran dentro de la señal de localización nuclear de Mdm2 y su fosforilación facilita la translocación de Mdm2 al núcleo. Una vez en el núcleo, Mdm2 se une al dominio de transactivación de p53 (región aminoterminal), bloqueando por tanto el reclutamiento de factores adicionales necesarios para la inducción de la expresión génica (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1993). La proteína Mdm2 puede también verse modificada tras el estrés celular y estas modificaciones pueden disminuir su habilidad para dirigir a p53 a la degradación proteosomal (Hjerrild et al., 2001; Maya et al., 2001).

Sin embargo, en condiciones normales de ausencia de estrés, Mdm2 dirige a p53 a la degradación proteosomal (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Mdm2 presenta una actividad ubiquitina ligasa E3 hacia varios residuos de lisina en el extremo carboxilo de p53 (Honda et al., 1997; Lai et al., 2001; Rodriguez et al., 2000). Esta poliubiquitinación facilita la exportación nuclear de p53 (Lohrum et al., 2001), al menos parcialmente necesaria para su degradación por el proteosoma (Roth et al., 1998; Shirangi et al., 2002; Xirodimas et al., 2001). Finalmente, tanto los proteosomas nucleares como citoplasmáticos 26S constituyen la maquinaria encargada de destruir las moléculas poliubiquitinadas de p53 (Maki et al., 1996; Shirangi et al., 2002; Xirodimas et al., 2001).

El nivel de la proteína del supresor tumoral p19/p14^{ARF} aumenta tras la activación de oncogenes como *E1a* (de Stanchina et al., 1998), *myc* (Zindy et al.,

1998) o *ras* (Palmero et al., 1998). $p19/p14^{ARF}$ se une a Mdm2 y lo secuestra en el nucleolo (Lohrum et al., 2000; Tao y Levine, 1999; Weber et al., 1999), permitiendo que p53 quede libre y activo como factor de transcripción y pueda ejercer su actividad supresora tumoral.

Entre las distintas situaciones de estrés en las que interviene p53, recientemente se ha observado la implicación de éste en la respuesta al estrés causado por una anómala biogénesis ribosomal. En este sentido, se demostró que la sobreexpresión de un mutante dominante-negativo de Bop1, una proteína nucleolar crítica para el procesamiento del ARN ribosómico y el ensamblaje de los ribosomas, producía una deficiencia en las subunidades ribosomales 60S en fibroblastos 3T3, que ocasionaba una parada en G1 dependiente de p53 (Pestov et al., 2001). También la actinomicina D, que impide la síntesis del ARN ribosómico y el ensamblaje de los ribosomas, desencadena la activación de p53 (Ashcroft et al., 1999; Ashcroft et al., 2000). Las proteínas ribosomales L5, L11 y L23 se asocian con la oncoproteína Mdm2 y activan a p53 inhibiendo la ubiquitinación y degradación de p53 mediada por Mdm2 (Dai y Lu, 2004; Dai et al., 2004; Jin et al., 2004; Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003). La sobreexpresión de L5, L11 y L23 desencadena la acumulación y activación de p53, induciendo una parada en G1 dependiente de p53 (Dai et al., 2004). Se ha demostrado que Mdm2 y estas proteínas ribosomales pueden formar al menos dos complejos en las células: Mdm2-L5-L11-L23 y p53-Mdm2-L5-L11-L23 (Dai y Lu, 2004), y ambos parecen ser independientes de los polisomas (Dai et al., 2004). Se ha propuesto, por tanto, que el complejo Mdm2-L5-L11-L23 funciona inhibiendo la ubiquitinación de p53 mediada por Mdm2. También se ha mostrado un efecto diferente, con otra proteína ribosomal: L26. En este otro caso, la inhibición parcial de L26 causaba una disminución en la traducción de p53 (Takagi et al., 2005). Estos autores afirman que la región no codificante 5' (5'UTR) del ARNm de p53 es esencial para la regulación de la traducción de p53 tras daño en el DNA, por la proteína ribosomal L26.

3.3. SENESCENCIA CELULAR.

La senescencia celular se define como la parada del crecimiento que retiene a las células irreversiblemente en la fase G1 del ciclo celular (Hayflick, 1965).

Originalmente, este tipo de parada del crecimiento se describió como una respuesta celular al acortamiento de los telómeros y se denominó senescencia replicativa, pero ahora se sabe que la senescencia puede inducirse por una amplia variedad de estímulos, tales como estrés oxidativo, daño en el DNA, o señales hiperproliferativas desencadenadas por oncogenes (Campisi, 2001) o por pérdida de genes supresores (Chen et al., 2005), por lo que el proceso ha pasado a denominarse senescencia celular, término más amplio que engloba a todos los tipos de senescencia.

Los diversos tipos de senescencia poseen características comunes: las células senescentes no responden a las señales mitogénicas, muestran un fenotipo característico (aparecen como células aplanadas y frecuentemente multinucleadas) y son resistentes a la apoptosis. Estas células exhiben marcadores específicos, tales como la actividad β -galactosidasa ácida asociada a senescencia (Dimri et al., 1995). El fenotipo senescente además está asociado a un patrón de expresión génica característico, reflejado por el incremento en los niveles de proteínas como p16^{INK4A}, p19^{ARF}, p53, PML, PAI-1, p27^{KIP1} (Schmitt, 2003). Muchas de estas proteínas no son simples marcadores, sino que intervienen activamente en el proceso de senescencia. Tal es el caso, por ejemplo, de PAI-1 (Kortlever et al., 2006). Asimismo, p53 ha demostrado ser de vital importancia en este proceso. La inactivación de p53, así como de p19^{ARF}, anula el proceso de la senescencia (Kamijo et al., 1997). Y al contrario, la expresión de p53 exógeno era capaz de inducir senescencia celular en células tumorales deficientes en p53 (Wang et al., 1998). *p21Cip1* es quizá el principal mediador de la parada del crecimiento inducida por p53 (el-Deiry et al., 1993) y, de acuerdo con esto, la expresión ectópica de *p21Cip1* ocasionaba un fenotipo senescente en células tumorales humanas (Bates et al., 1998).

No obstante, la senescencia celular también puede activarse en células carentes de *p21Cip1* (Chang et al., 1999; Pantoja y Serrano, 1999), con lo que factores adicionales a p21 deben contribuir en la senescencia inducida por p53.

Además de p53, *retinoblastoma* es un regulador esencial de la senescencia celular. La actividad de pRb está controlada indirectamente por p16^{INK4A}, que como señalamos en un apartado anterior, es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina D. De hecho, p16^{INK4A} ectópico es un potente inductor de senescencia celular, siempre que pRb esté presente (Dai y Enders, 2000; Serrano et al., 1995;

Timmermann et al., 1998). Sin embargo, el hecho de que p53 ectópico pueda activar la senescencia celular en células tumorales de pulmón H1299, a pesar de la ausencia de p16^{INK4A} (Wang et al., 1998), sugiere que también p16^{INK4A} es dispensable para la senescencia celular mediada por p53. Y es que pRb puede ser activado por vías diferentes de las controladas por p16^{INK4A}. En este sentido, anteriormente hablamos de la desfosforilación de pRb que ocurre en respuesta a señales inhibitorias de crecimiento. Ésta tiene lugar en el periodo comprendido desde la anafase hasta la fase G1 y depende de la proteína fosfatasa 1 (Ludlow et al., 1993).

Además, también se baraja la posibilidad de que la parada del crecimiento pueda depender no sólo de pRb, sino también de las otras proteínas de la familia de retinoblastoma: p107 y p130(Rb2) (Du y Pogoriler, 2006; Helmbold et al., 2006; Kapic et al., 2006).

Aunque aún existe bastante desconocimiento en cuanto a los mecanismos subyacentes a la senescencia celular, hay evidencias contundentes de que la formación de heterocromatina en la proximidad de los promotores que controlan la expresión génica relacionada con la progresión en el ciclo celular, podría estar implicada en el mantenimiento de una parada celular irreversible (Narita et al., 2003). La formación de foci heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF) coincide con el reclutamiento tanto de proteínas de unión a heterocromatina como de pRb en torno a promotores que responden a E2F y está asociada con la represión estable de los genes diana de E2F. Tanto la formación de los SAHF como el silenciamiento de los genes diana de E2F, dependen de la integridad de la vía de *retinoblastoma* y no ocurren en células paradas reversiblemente (Narita et al., 2003; Zhang et al., 2005).

3.3.1. Senescencia inducida por oncogenes.

La primera indicación de la existencia de este mecanismo, provenía de estudios *in vitro* que revelaban que, bajo ciertas circunstancias, la señalización oncogénica podía provocar, paradójicamente, una potente respuesta de parada del crecimiento. La expresión del oncogén *ras* en células primarias humanas o de ratón ocasionaba una parada permanente en G1, que estaba acompañada de la

acumulación de p53 y p16^{INK4A} y que era indistinguible de la senescencia celular (Serrano et al., 1997).

Estudios recientes proclaman que la activación de la respuesta a daño en el DNA (DDR) tiene una función causal en la senescencia inducida por oncogenes. Esta afirmación se apoya en la observación de que la inactivación individual de varios factores de respuesta a daño en el DNA (DDR) evitaba la senescencia inducida por oncogenes (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Estos autores afirman que la actividad eficiente de las vías de DDR es a la vez causal y necesaria en el mantenimiento de la senescencia inducida por oncogenes. Por tanto, la hipótesis que defienden es que la hiper-replicación del DNA inducida por oncogenes tales como *ras* (Di Micco et al., 2006) o *mos*, *cdc6* y *ciclina E* (Bartkova et al., 2006), desencadenaría una respuesta frente a ese daño en el DNA (DDR), que acabaría desembocando en senescencia.

No obstante, los mecanismos moleculares que restringen la proliferación celular en respuesta a oncogenes activados no están aún completamente dilucidados.

3.3.2. Senescencia celular como mecanismo de acción antitumoral.

Como las señales inductoras de senescencia anteriormente citadas (daño en el DNA, señales hiperproliferativas) tienen en común la capacidad de contribuir al cáncer, se ha propuesto que la senescencia celular podría actuar como un mecanismo de acción antitumoral, deteniendo el crecimiento de células con un elevado riesgo de tumorigénesis (Campisi, 2001). Así, la detención irreversible del crecimiento de las células o senescencia, actuaría como un mecanismo paralelo al de la apoptosis o muerte celular programada, para evitar la propagación de errores en las células hijas. Se cree que el hecho de que actúe un proceso u otro depende del tipo celular y del contexto determinado.

De acuerdo con su papel en la supresión del cáncer, la senescencia celular está controlada por varios supresores tumorales (Bringold y Serrano, 2000; Lundberg et al., 2000). Los más cruciales de éstos codifican para las proteínas p53 y pRb, que son centrales en dos vías supresoras tumorales esenciales, previamente detalladas en apartados anteriores. Juntos, *p53* y *rb1* constituyen las funciones más comúnmente perdidas en cánceres de mamíferos. Es decir, parece existir una

presión de selección para que la célula cancerosa desregule las vías que la llevarían a senescencia.

Pese al atractivo de la hipótesis que considera a la senescencia celular como un mecanismo antitumoral, durante un tiempo ha estado en entredicho por el temor de que se tratase de un fenómeno artificial y que tuviese lugar sólo *in vitro* debido al estrés derivado del mantenimiento de las células en cultivo, pero que careciera de relevancia *in vivo* (Sherr y DePinho, 2000).

Sin embargo, la senescencia ha ido mostrándose como un proceso que realmente ocurre *in vivo* y que representa una barrera frente al desarrollo tumoral. Estudios recientes aportan evidencias *in vivo* que subrayan el papel de la senescencia en la limitación de la tumorigénesis iniciada por oncogenes (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005) o por la inactivación de supresores tumorales (Chen et al., 2005). Los tumores premalignos mostraban marcadores de senescencia y los malignos no lo hacían, en un modelo de ratón que expresaba el oncogén *ras* (Collado et al., 2005). Los linfomas de células T, originados en un modelo de ratón que expresaba el oncogén *ras* entraban en senescencia tras la terapia con drogas cuando la apoptosis estaba bloqueada (Braig et al., 2005). Melanocitos humanos que sobreexpresaban el oncogén *bra*^{F600} estaban detenidos en su crecimiento y mostraban marcadores clásicos de senescencia (Michaloglou et al., 2005). Todo lo anterior apoya la teoría de que la senescencia inducida por oncogenes representa un proceso fisiológico de protección frente al cáncer.

Además, se ha visto que la inducción de la apoptosis es insuficiente para justificar los efectos terapéuticos de los agentes anticancerosos y que la quimioterapia y la radiación son capaces de inducir no sólo apoptosis, sino también parada irreversible del crecimiento a través del programa de senescencia. Varios tipos de células tumorales desarrollaron el fenotipo senescente tras el tratamiento con drogas *in vitro* e *in vivo* (Roninson, 2002; Schmitt et al., 2002).

También parece paradójico que las células senescentes secreten al medio factores que precisamente puedan promover la tumorigénesis. De hecho, los fibroblastos senescentes crean un microambiente que promueve el crecimiento de células epiteliales preneoplásicas, tanto en cultivo como *in vivo* (Dilley et al., 2003; Krtolica et al., 2001). Una posible explicación sería que la senescencia se tratase de

un proceso con un efecto pleiotrópico antagonista; es decir, un proceso que es beneficioso para el organismo en un período de la vida, pero perjudicial en un período más avanzado. Así, aunque la senescencia celular suprime la tumorigénesis en los estadios tempranos de la vida, quizá pueda promover el cáncer en organismos ancianos (Campisi, 2005; Poyatos y Carnero, 2004).

3.4. MOLÉCULAS SEÑALIZADORAS NO PROTEICAS CON RELEVANCIA EN CÁNCER.

El peso de la señalización celular no sólo recae en las moléculas proteicas. En este sentido queríamos destacar el papel de las especies reactivas (RS) y de los lípidos con función transductora de señales.

Las RS de varios tipos se forman *in vivo* y muchas son potentes agentes oxidantes, capaces de dañar el DNA y otras biomoléculas. Las RS pueden afectar el comportamiento celular de muchas maneras. Dependiendo del tipo y el nivel de especie reactiva presente, del tiempo de exposición, de la cantidad de defensas celulares antioxidantes que eliminan RS y de las actividades de los sistemas de reparación celular que arreglan el daño oxidativo, las células expuestas a RS pueden mostrar un aumento de la proliferación, parada del ciclo celular, senescencia, apoptosis o necrosis (Halliwell, 2007). En concreto, se ha demostrado que las proteínas Ras regulan la producción de especies oxidantes y que el aumento de los niveles intracelulares de H_2O_2 representa una señal crítica en la mediación de la senescencia replicativa (Lee et al., 1999).

Por otro lado, en las dos últimas décadas se ha resaltado el hecho de que, además de la importante función de los lípidos a nivel estructural, muchos actúan como moléculas implicadas en la transducción de señales. Tal es el caso de la ceramida y de la esfingosina-1-fosfato, por ejemplo. Estos dos esfingolípidos tienen efectos opuestos en muchos sistemas en los que la ceramida normalmente inhibe proliferación y promueve apoptosis (Hannun, 1996) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) estimula el crecimiento y suprime la apoptosis (Olivera y Spiegel, 1993). Parece que el balance de estos dos esfingolípidos mensajeros es un factor determinante en la decisión celular de vida o muerte (Reynolds et al., 2004), al menos en esos sistemas.

Las ceramidas tienen un papel señalizador fundamental, actuando como segundos mensajeros, especialmente en rutas que se activan por diversos estímulos de estrés (Hannun, 1996; Hannun y Luberto, 2000). Las ceramidas pueden generarse tanto por la síntesis *de novo* como por el catabolismo de esfingomielina dependiente de esfingomielinasas (Reynolds et al., 2004) y un aumento de la concentración intracelular de ceramida es suficiente para inducir muchas de esas respuestas a estrés, incluyendo apoptosis, parada del ciclo celular y senescencia celular (Hannun y Luberto, 2000).

Poco se sabe acerca de las vías de señalización hacia senescencia mediadas por lípidos. Sin embargo, los niveles endógenos de ceramidas están marcadamente elevados, y además específicamente si se comparan con otros lípidos, en células senescentes (Venable et al., 1995). Además, la adición de ceramidas exógenas, a concentraciones similares a las alcanzadas endógenamente en células senescentes, eran capaces de inducir un fenotipo senescente en fibroblastos humanos diploides jóvenes (Venable et al., 1995).

Las ceramidas generadas por una u otra vía interaccionan con diversas dianas intracelulares incluidas quinasas, fosfatasas y proteasas, para activar moléculas efectoras (Kolesnick, 2002; Ruvolo, 2003). Así, las ceramidas regulan directamente las proteínas fosfatasas activadas por ceramidas (CAPPs) entre las que se incluyen, por ejemplo, las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A (Chalfant et al., 1999). PP2A está relacionada con la inducción de apoptosis (Chiang et al., 2003; Deng et al., 1998; Harmala-Brasken et al., 2003). PP1, como ya señalamos en un apartado anterior, es la fosfatasa encargada de llevar a cabo la desfosforilación de pRb (Nelson et al., 1997) en respuesta a señales inhibitorias del crecimiento. La forma hipofosforilada de pRb inhibe la proliferación celular (Chen et al., 1989).

OBJETIVOS

4.OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo ha sido la identificación de nuevas dianas críticas en el proceso de inmortalización celular, centrándonos concretamente en la vía de p53 (e independientemente de p21).

Para ello se propusieron los siguientes objetivos individuales:

1. Generación de herramientas celulares para la identificación de genes involucrados en el proceso de la senescencia celular.
2. Rastreo genético para identificar genes cuya ausencia de función evitara la senescencia inducida por *p53/ras* en nuestro sistema.
3. Caracterización de esos genes; su papel en senescencia y las consecuencias moleculares y celulares tras su alteración, así como su interrelación con otros genes implicados en el proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. REACTIVOS BIOLÓGICOS USADOS.

Antibióticos: puromicina (Calbiochem), higromicina (Calbiochem), estreptomicina (Sigma), ampicilina (Sigma), zeocina (Invitrogen).

Tratamientos: Doxorubicina (Sigma); H₂O₂ (Sigma); ITS (Sigma); ¹⁴C-Serina (Amersham); Ceramida C₆ (N-hexanoil-esfingosina) (Biomol).

Vectores utilizados: pWZLhygro-p53val135, pBabepuro, pBabepuro-HRasV12, pMaRX-IV puro, pMaRX-IV puro-diferentes fragmentos antisentido, pCOC-Mdm2, pBabepuro-p53wt, pGL3.Bax, pGL3.p21, pWZLneo-eGFP-p53, pLPCX-p53mRNAfull251 (del laboratorio de Michael Kastan), pRetrosuper.

Cepas bacterianas: Todos los plásmidos utilizados en la tesis se propagaron en la cepa de *E.coli* TOP10 (Invitrogen) o DH10B-lac-trfA súper-electrocompetentes. Se crecieron en medio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L NaCl, pH 7.0) o LB bajo en sal (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2.5 g/L NaCl, pH 7.0) cuando el antibiótico a usar era zeocina, a 37°C, con agitación, durante unas 16h.

5.2. TÉCNICAS BÁSICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

5.2.1. Generación de bacterias súper-electrocompetentes.

Para generar esta herramienta, partimos de bacterias DH10B-lac-trfA guardadas a -80°C en forma de cultivo líquido en medio LB con 20% de glicerol. Pusimos un inóculo a partir de éstas, en 10 mL de LB con estreptomicina (30 µg/mL), dejando crecer el cultivo durante la noche.

Al día siguiente, se inocularon 5mL del cultivo anterior en 500mL de LB con estreptomicina. Se cultivaron a 37°C y agitando a 240 rpm hasta que alcanzó la densidad óptica de 0.6 a 600nm.

Entonces repartimos el cultivo en dos tubos de centrifuga cónicos pre-enfriados (Corning # 25350-250) y los pusimos en hielo mientras agitábamos para enfriar el cultivo rápidamente.

Centrifugamos a 4500 rpm y a 4°C, durante 7 min. Eliminamos el sobrenadante todo lo posible, primero por decantación y después por aspiración del remanente. Resuspendimos las células suavemente en 4mL de glicerol al 10% en agua Milli-Q, estéril y frío (usando pipetas con filtro pre-enfriadas). Después añadimos 240 mL de glicerol al 10% y mezclamos, siempre en frío.

Volvimos a centrifugar y eliminar el sobrenadante, pero añadiendo 120 mL de glicerol al 10%. Repetimos este paso dos veces más.

Volvimos a centrifugar y eliminar el sobrenadante, pero esta vez resuspendimos las células en 8 mL de glicerol al 10% y las transferimos a tubos Falcon de 50mL. Centrifugamos (a 4500 rpm y 4°C) durante 5 min.

Eliminamos el sobrenadante y resuspendimos las células con 1mL de glicerol al 10%. Hicimos una dilución tomando 6.25 μ L de bacterias en 2.5 mL de tampón de glicerol, y medimos la densidad óptica a 600 nm de la dilución. En este punto se espera un valor mínimo de 0.2.

Hicimos alícuotas de 50 μ L, que congelamos inmediatamente con nitrógeno líquido, y que almacenamos después a -80°C.

5.2.2. Transformación de células electrocompetentes (electroporación).

Se descongelaron en hielo las alícuotas necesarias de células electrocompetentes y se añadió una cantidad apropiada de DNA (habitualmente 2 μ L de una mezcla de ligación o unos 100 ng de plásmido purificado). La mezcla de bacterias y DNA se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad) previamente enfriada en hielo y se sometió a una diferencia de potencial de 2500V durante 5 ms, utilizando un equipo Multiporator (Eppendorf). Después de la transformación se añadieron 400 μ L de medio SOC (20 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a temperatura ambiente y se transfirió la mezcla a un tubo de 1.5 mL para incubar 1 h a 37°C. Después se extendió el cultivo en placas de LB-agar (o LB bajo en sal con agar) con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron a 37°C durante 14-16h. Las colonias obtenidas se analizaron mediante digestión de DNA del plásmido con enzimas de restricción o mediante PCR. Las que contenían la construcción adecuada se conservaron a -80°C en forma de cultivo líquido en medio LB con 20% de glicerol.

5.2.3. Transformación de células quimiocompetentes.

A 100 μ L de bacterias quimiocompetentes se les añadió una cantidad apropiada de DNA. La mezcla de bacterias y DNA se incubó durante 30 minutos en hielo y después se dio un choque de calor a 42° C en un baño de agua durante 45s. A continuación se mantuvieron las células en hielo durante 2 minutos y se añadieron 400 μ L de medio SOC a temperatura ambiente. Se incubaron 1 h a 37° C. Después se extendió el cultivo en placas de LB-agar con el antibiótico de selección apropiado y se incubaron a 37°C durante 14-16h. Se procedió igual que en el apartado anterior para confirmar que las células habían introducido el plásmido adecuado.

5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación de fragmentos de DNA por PCR se realizó mediante un procedimiento estándar. Se preparó una mezcla 0.2 mM que contenía cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada uno de los iniciadores, 2 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq Pol y la cantidad adecuada de DNA molde, todo ello diluido en el tampón de reacción suministrado por el proveedor de la enzima. Las reacciones se realizaron en termocicladores Biometra T3. Las condiciones de reacción fueron específicas para cada caso, pero se siguió un programa estándar: 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de amplificación (1 minuto a 95°C, 2 minutos a 55°C, 2 minutos a 75°C) y una extensión final de 5 minutos a 75°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel al 1% de agarosa.

5.2.5. Purificación de DNA a partir de un gel de agarosa.

El DNA (producto de PCR o fragmento de restricción) se separó en un gel de agarosa a la concentración apropiada (1-2%), con bromuro de etidio (Sigma). Las bandas de interés se cortaron del gel con un bisturí estéril, visualizándolo a través de un transiluminador de luz ultravioleta. La extracción del DNA se realizó mediante el sistema QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la adsorción selectiva del DNA a una membrana de gel de sílice en presencia de una alta concentración de sales (la presencia de una sal caotrópica, el tiocianato de guanidinio, facilita además la solubilización de la

agarosa). Después de un lavado, el DNA se eluyó en un tampón de baja concentración de sales a pH ligeramente básico (Tris pH 8.5).

5.2.6. Clonaje de productos de PCR.

Los productos de PCR se clonaron en pGEM-T Easy Vector (Promega). Este vector posee extremos protuberantes 3' con un residuo desoxitimidina que permite la ligación directa de fragmentos con desoxiadenosinas 3' protuberantes como los generados por la polimerasa Taq.

Las reacciones se realizaron en un volumen de 10 µL que contenía: 5 µL del tampón de reacción de la enzima (2X), 1 µL de vector pGEM-T Easy Vector (50 ng), 1 µL de DNA ligasa T4, 2 µL del producto de PCR de interés y 1 µL de agua destilada. Esta mezcla se incubó durante 1h a temperatura ambiente y con ella se transformaron células quimio o electrocompetentes. El DNA plasmídico se extrajo mediante el protocolo descrito en 5.2.9 y se analizó mediante digestión con enzimas de restricción y/o secuenció para verificar su identidad.

5.2.7. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Se preparó una mezcla que contenía 1-5 µg de DNA, 2 unidades de enzima por microgramo de DNA y el tampón apropiado para la enzima, diluido a una concentración 1X en agua destilada, en un volumen total de 20-60 µL. La mezcla se incubó de 1 a 4 h a 37°C y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa. En los casos en los que los fragmentos de restricción debían utilizarse en una ligación posterior, el DNA se purificó a partir del gel tal como se ha descrito en el apartado 5.2.5.

5.2.8. Ligación.

Las reacciones de ligación se prepararon mezclando, en hielo, los fragmentos de restricción purificados (hasta un volumen de 7 µL), 1 µl de DNA ligasa de T4 (Invitrogen) y 2 µl del tampón de reacción de la enzima (5X). La mezcla se incubó a 16°C durante 12-16 h y con ella se transformaron células electro o quimiocompetentes. Habitualmente, para ligaciones de extremos cohesivos, se utilizó una relación molar vector/inserto 1:3 y con extremos romos, de 1:6.

5.2.9. Extracción de DNA plasmídico.

La extracción de DNA se puede realizar a partir de pequeños o grandes volúmenes, según la cantidad que necesitemos. El protocolo se basa en ambos casos en una lisis alcalina seguida de la precipitación y purificación del DNA en una columna de intercambio iónico (sílice-dietilaminoetanol). El DNA se une a la columna en condiciones apropiadas de pH y baja concentración de sales, los contaminantes se eliminan en un lavado con tampón de fuerza iónica intermedia y el DNA se eluye en un tampón de alta concentración de sales. Por último, el DNA se precipita con isopropanol para concentrarlo y eliminar sales. En ambos casos utilizamos el Plasmid kit de Qiagen para mini, midi o maxi, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se describe el protocolo brevemente a continuación. Se crecía el cultivo líquido en medio selectivo (LB con el antibiótico apropiado según el plásmido) durante 12-16 h a 37°C, con agitación. El volumen de cultivo utilizado dependía de si era una maxi, midi o mini (250, 100 y 5 mL, respectivamente). Las células se recuperaron por centrifugación (en el caso de las maxis, todas las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Avanti J-25 de Beckman) durante 20 minutos y se resuspendieron en la solución de resuspensión (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 µg/mL). Después se añadió la solución de lisis (NaOH 200mM, SDS 1%), mezclando por inversión e incubando 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó al añadir acetato potásico 3.1 M, pH 5.5, mezclando inmediatamente. Después se centrifugó durante 30 minutos y el sobrenadante se echó en una columna previamente equilibrada (con una solución de NaCl 600mM, acetato potásico 100mM, TritónX-100 al 0.15%, pH 5) dejándolo caer por gravedad. Después, la columna se lavó dos veces con tampón de lavado (NaCl 800 mM, acetato sódico 100mM, pH 5) y el DNA se eluyó con tampón de elución (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 100mM pH 8.5). Finalmente el DNA se precipitó por adición de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugación durante 30 minutos. Se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada.

5.3. CULTIVOS CELULARES.

5.3.1. Líneas celulares.

En la Tabla 2 se recogen las características de las líneas celulares utilizadas en el presente trabajo, incluyendo el medio de cultivo, el origen y el tipo celular que representan.

Línea celular	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
Linx-E	Humana	HEK293T que expresan los genes retrovirales <i>gag-pol</i> y <i>env</i> (ecotrópico)	DMEM+10% FBS	Adherentes	Dr.Beach
MEFs p53 ^{-/-}	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro lab (embriones 13.5 días)
MEFs p53 ^{-/-} ; p21 ^{-/-}	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Nuestro lab (embriones 13.5 días)
MEFs p53 ^{-/-} ; mdm2 ^{-/-}	Ratón	Fibroblastos embrionarios	DMEM+10% FBS	Adherentes	Dra.Lozano
HCT116 p53 ^{-/-}	Humana	Carcinoma de colon	McCoy's+10% FBS	Adherentes	Dr.Vogelstein
SAOS 2	Humana	Sarcoma	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
NIH3T3	Ratón	Fibroblastos inmortalizados	DMEM+10% FBS	Adherentes	ATCC
H1299	Humana	Carcinoma de pulmón	RPMI 1640+ 10% FBS	Adherentes	Dr.Silva

Tabla 2: Características de las líneas celulares utilizadas. ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

Otras líneas celulares utilizadas fueron: los sarcomas SW872, 1455, A673 y otros establecidos en nuestro laboratorio, los fibroblastos IMR90, la línea tumoral de colon OJC4, la de cérvix HeLa, las de próstata PC3 y Du145, el melanoma A375, las de mama MCF7 y HBL100, el glioblastoma U87MG, la línea de leucemia mieloide K562 y una línea tumoral de tiroides establecida en nuestro laboratorio.

5.3.2. Cultivo y conservación de las líneas celulares.

Todas las líneas se cultivaron en medio DMEM, RPMI 1640 o McCoy's (Sigma) suplementados con glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS)(Sigma), 40 u/mL de penicilina, 40 µg/mL de estreptomicina y 1 µg/mL de fungizona (anfotericina B)(Gibco/Invitrogen). Las células se crecieron en placas de 10 cm (Falcon) y se subcultivaron 1:4-1:6 cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Sigma). Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C, 39°C o 32°C, en una atmósfera de 5% CO₂ (Nuair). Todas las manipulaciones se hicieron en una campana de flujo laminar de Clase II Bio-II-A (nivel de seguridad biológica 2; Telstar).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 mL, en su medio de cultivo normal con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para descongelar un vial, se sumergía en un baño de agua a 37°C durante 2 minutos; a continuación se centrifugaba el contenido en 9 mL de medio con suero y se resuspendían las células en su medio de cultivo habitual.

5.3.3. Transfección por precipitación con fosfato cálcico.

La mezcla de CaCl_2 , DNA y tampón fosfato origina la precipitación de pequeñas partículas insolubles de fosfato cálcico que contienen el DNA condensado. Estos complejos se adhieren a la membrana plasmática y entran en la célula por fagocitosis.

Las células se plaquean el día anterior a la transfección, de manera que estén a una confluencia del 50-80% en el momento de la transfección. Entre 1 y 4 h antes de la transfección se cambia el medio a las células, añadiendo 10 mL de medio DMEM (para una placa de 10 cm). En un tubo de PET (Polietileno tereftalato) de 15 mL se mezclan 20-30 μg del DNA correspondiente, 50 μL de CaCl_2 2.5 mM y se lleva hasta 500 μL con agua Milli-Q estéril. A esto se le añaden 500 μL de tampón HBS 2X (NaCl 280 mM, HEPES 50 mM, Na_2HPO_4 1.5 mM, pH 7.0) mezclando vigorosamente. Se deja la mezcla a temperatura ambiente durante media hora para permitir que se formen los cristales de fosfato cálcico y a continuación se añaden sobre el cultivo celular gota a gota. Se dejan sobre las células durante 16 h, a 37°C, y tras ese tiempo se les cambia el medio a las células, previo lavado con PBS. Se incuban otras 24 ó 48h a 37°C para utilizarlas según procediera en cada caso.

5.3.4. Aislamiento de clones celulares.

Si se trata de una transfección transitoria, 48 h tras la transfección ya se pueden analizar las células. Si por el contrario, se pretende hacer una transfección estable, 48 h tras la transfección, se amplían 1:3 o 1:4 y comienza la selección con el antibiótico apropiado, manteniéndolo durante el tiempo necesario (que vendrá dado por la muerte del control negativo: células sin transfectar). Así se van seleccionando clones individuales o bien poblaciones celulares. Una vez estamos seguros de que la selección ha tenido lugar, podemos bajar la concentración de antibiótico a la mitad, como mantenimiento de la selección.

5.3.5. Infección retroviral.

Las partículas retrovirales se produjeron por transfección transitoria de las células LinX-E con el vector retroviral de interés, mediante el protocolo del fosfato cálcico (descrito en 5.3.3). Tras 16 h de incubación con los cristales a 37°C, se les cambió el medio a las células y se incubaron a 32°C (para aumentar la estabilidad de los virus) durante 48 h. Después, el sobrenadante que contenía los virus se pasó por un filtro de acetato de celulosa (0.45 µm de diámetro de poro, Millipore) y se suplementó con 8 µg/mL de polibreno (un polication que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular; Sigma) y un volumen igual de medio fresco. Para la infección, el medio de cultivo de las células que iban a ser infectadas (que estaban a un 40-50% de confluencia) se reemplazó por el sobrenadante viral apropiado, y las placas fueron centrifugadas (1 h, 1500 rpm) e incubadas a 32°C (o 37°C, cuando las células receptoras detenían su crecimiento a 32°C) durante 8 h. Después, se les cambió el medio y se mantuvieron 48-62 h a 37°C (o 39°C), momento en el que se comenzó con la selección apropiada, al mismo tiempo que se ampliaron las células 1:4. Las poblaciones celulares infectadas se seleccionaron en puromicina (2 µg/mL) para los vectores derivados de pBabe, pMaRX-IV puro y pRetrosuper, o en Higromicina (50 µg/mL) para los vectores basados en pWZL-Hygro. Una vez hubo muerto el control negativo (células sin infectar), se procedió a bajar la concentración del antibiótico de selección a la mitad, como mantenimiento de la selección.

5.3.6. Generación de la librería de fragmentos antisentido de ratón y transducción de MEFs p53^{-/-}; p21^{-/-}; p53^{ts}; ras.

El ARN total de fibroblastos de ratón senescentes fue tratado con DNasa libre de Rnasa (10 U/µg ADN) durante 30 min a 37°C y se extrajo con fenol. El ARN se corrió en un gel de electroforesis al 4 % acrilamida-7M urea y el ARNm fue purificado. Para generar la librería se usaron alícuotas de 2 µg de ARNm. Se sintetizaron fragmentos de cDNA amplificados al azar, se seleccionaron por tamaño (50-500 nt) en una columna S400 (Pharmacia) y se clonaron en los sitios *EcoRI* y *XhoI* del pMARXIV puro en la orientación antisentido (Carnero et al., 2000).

Para generar los virus, se plaquearon 5x10⁶ LinXE/placas de 10 cm y se incubaron 24 h. Después, se transfectaron usando el método del fosfato cálcico con

20 µg de la librería en plásmido retroviral. Se recogieron los virus y se realizó la infección como hemos descrito anteriormente. Después de seleccionar con 2 µg/mL de puromicina, los MEFs p53^{-/-}; p21^{-/-}; p53^{ts}; ras fueron sembrados a baja densidad e incubados a 32°C (temperatura permisiva para p53^{ts}) durante 15 días. Las colonias formadas durante este período (que contenían fragmentos antisentido capaces de evadir el efecto de parada del crecimiento causado por p53) fueron seleccionadas y mantenidas de forma independiente.

5.3.7. Recuperación *in vitro* de los provirus.

El ADN genómico total de cada clon capaz de evadir el efecto de p53 se extrajo a partir de placas de 10 cm confluentes. Se trató después con Rnasa (50 µg/mL, 30 min) y proteinasa K (100 µg/mL de concentración final) y se extrajo dos veces con fenol/cloroformo. Tras la precipitación con etanol, el ADN genómico se lavó extensivamente con etanol al 70% y se disolvió en 200 µL de agua ultrapura.

Para escindir los provirus, se digirió ADN genómico con recombinasa CRE (20 µL DNA genómico, 5µL tampón, 1 µL enzima CRE y agua Milli-Q hasta llegar a los 50 µL totales) durante 3 h a 37°C. El tampón de la enzima CRE lleva Tris HCl 1M, ClNa 5M, Cl₂Mg 1M, BSA (1mg/mL), DTT 1M y agua Milli-Q. Después se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN se lavó extensivamente con etanol al 70% y se disolvió en 5 µL de agua. Con la mitad (2.5 µL) se electroporaron bacterias DH10B-lac-trfA súper-electrocompetentes y los provirus se rescataron a partir de colonias bacterianas resistentes a zeocina.

5.4. ENSAYOS CELULARES.

5.4.1. Actividad β-gal asociada a senescencia.

La actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal) se midió como se ha descrito previamente (Dimri et al., 1995), salvo porque las células se incubaron en 5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal) a pH 5.5 para aumentar la sensibilidad del ensayo en MEFs. El porcentaje de células que expresaban SA β-Gal se cuantificó examinando 200 células por placa de 10 cm 3 veces.

5.4.2. Curvas de crecimiento.

Las células se infectaron como antes. En la duplicación de la población (PD) duodécima, 3×10^3 células se sembraron en placas de 2.5 cm. A intervalos de 2-3 días, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 0.5% (Sigma) y se tiñeron con cristal violeta al 1% (Sigma) en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4). Después de un lavado concienzudo, las placas se dejaron secar y el cristal violeta se disolvió en ácido acético al 10% y se cuantificó la absorbancia a 595nm como una medida relativa del número de células.

5.4.3. Ensayo clonogénico.

Este ensayo mide la capacidad de proliferación de las células basándose en su capacidad de formar colonias después de ser sembradas a muy baja densidad. Se sembraron 1000 células en placas de 10 cm de diámetro y se mantuvieron a 39°C durante 24 horas, después se cambiaron a 32°C durante 2 días. Las células se cambiaron nuevamente a 39°C y se dejaron crecer durante 10 días. Tras ese tiempo, las colonias fueron fijadas y teñidas con cristal violeta y después se contaron.

5.4.4. Cambios de temperatura y análisis de la capacidad formadora de colonias.

MEFs p53^{-/-};ts transducidos con determinados fragmentos antisentido se sembraron a baja densidad (6×10^4 células/ placa de 10cm diámetro) en dos placas hermanas que se incubaron a 39°C o a 32°C. Tras 15 días, las colonias fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Se contaron para comparar el número de colonias entre la placa incubada a 32°C y la placa hermana mantenida a 39°C.

5.4.5. Tratamiento de células NIH3T3 con doxorubicina y H_2O_2 .

Las células NIH3T3 transducidas establemente con los fragmentos antisentido apropiados o con el vector vacío pMaRX-IV puro se sembraron en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, las células a un 50-75% de confluencia se trataron con doxorubicina (0.4 $\mu\text{g/mL}$ ó 0.8 $\mu\text{g/mL}$, en el medio habitual de las células), durante 8 ó 24 horas, o con 100 μM de H_2O_2 durante 6 horas. Tras este periodo de tiempo, se extrajeron los lisados celulares tal como se indica en el apartado “Extracción total de proteína”.

5.4.6. Sobreexpresión de las diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca* y valoración de la formación de colonias.

Las células HCT-116 p53-/- se sembraron en placas de 6cm de diámetro. Al día siguiente, las células a un 50% de confluencia se transfectaron con los DNAs apropiados (las diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca*) usando el protocolo por precipitación con fosfato cálcico. Tras 16h, se les dio un choque de glicerol (DMEM suplementado con un 10% de glicerol) durante 1min. Inmediatamente después las células se lavaron con PBS y a continuación se les añadió medio fresco y se siguieron cultivando a 37°C. 48h tras la transfección, las células se tripsinizaron y se pasaron desde las placas de 6cm a placas de 10cm de diámetro, en medio de selección con 0.5 µg/mL de puromicina. Transcurridos 12 días desde el comienzo de la selección, las colonias resistentes se fijaron con glutaraldehído al 0.5% en PBS y se tiñeron con cristal violeta.

Las células SAOS 2 se sembraron en placas de 6cm de diámetro. Al día siguiente, las células a un 70% de confluencia se transfectaron con las diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca*, usando el agente de transfección comercial Effectene® (de QIAGEN). Para seleccionar las células que efectivamente habían incorporado los plásmidos de interés, usamos medio con 0.5 µg/mL de puromicina para cultivar las células transfectadas, pasándolas a placas de 10 cm de diámetro. 10 días después de haber comenzado la selección, las colonias se fijaron con glutaraldehído al 0.5% en PBS y se tiñeron con cristal violeta.

5.4.7. Ensayo de niveles intracelulares de ceramidas mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Para la extracción de glicerofosfolípidos y esfingolípidos y para su posterior análisis, se sembraron células en placas de 6 pocillos a una densidad de 25×10^4 células/ pocillo, y cada condición se sembró por triplicado. Se marcó radiactivamente el experimento con 1 µCi/mL de ^{14}C -Serina. Todas las placas se mantuvieron a 39°C durante 48 horas. Después de ese tiempo, a las muestras correspondientes a la condición de 39°C, se les aspiró el medio de cultivo y, tras un lavado con PBS, las placas se congelaron a -80°C. En cuanto a los pocillos correspondientes a la condición de 32°C, tras añadirles 1mL de medio adicional, se mantuvieron 16 horas

a 32°C. Pasado ese tiempo, se les aspiró el medio, se lavaron una vez con PBS y las placas se congelaron a -80°C.

Para proceder a la extracción lipídica se descongelaron las placas de 6 pocillos en hielo y se añadió sobre cada pocillo la cantidad necesaria de metanol-agua para una proporción final de cloroformo-metanol-agua de 30:15:3(v/v/v), se recogió con un rascador y se transfirió cada punto a un tubo de polipropileno. A continuación se añadió la cantidad necesaria de cloroformo a cada tubo hasta alcanzar una proporción final de cloroformo-metanol-agua 30:15:3 (v/v/v). Cada tubo se agitó 15 seg y se centrifugó 5 min a 3000 rpm. La fase orgánica, que es donde permanecen los lípidos, se separó de la fase acuosa y se evaporó en atmósfera no oxidante de N₂.

El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC). Para ello, los lípidos resultantes se resuspendieron en 60 µL de cloroformo-metanol (1:1 v/v), se cargaron en una placa de TLC de gel de sílice de 60 Amstrongs y se dejaron secar. La placa se introdujo en una cubeta previamente equilibrada durante la noche anterior con fase móvil cloroformo-metanol-amonio 2M en proporciones 65:25:4 (v/v/v) y se corrió durante 1 hora. La cuantificación de las bandas de interés se realizó mediante un sistema de radiografía electrónica (Instantimager; Pakard, Meriden, CT, USA).(Hannun y Luberto, 2000).

5.4.8. Adición de ceramida exógena.

Los MEFs p53^{-/-};ts control o MEFs p53^{-/-};ts transducidos con ARN de interferencia (shRNA) contra *ppp1ca* se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 10⁵ células / pocillo. Tras 24 h a 39°C, las placas se mantuvieron a 32°C durante las 2h previas a la adición de 10 µM ó 20 µM de ceramida C₆ (N-hexanoil-esfingosina) (de Biomol) y se mantuvieron a 32°C desde entonces. 48h tras la primera adición, se volvió a añadir medio fresco con nueva ceramida C₆. 72h tras la adición de ceramida, las células se fijaron con glutaraldehído al 0.5% en PBS y se valoró la morfología senescente bajo el microscopio.

5.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE ARN.

5.5.1. Extracción de ARN total.

El ARN total de los clones o las líneas celulares se purificó con la solución TRI-REAGENT (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio), según las indicaciones del fabricante. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 mL del reactivo y utilizando un rascador, se extrajo el lisado celular y se echó en un tubo de 1.5 mL. Se homogenizó la muestra y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la separación de las fases, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente. Tras la incubación de la muestra durante 2-15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 12000 x g, en frío. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se precipitó el ARN con 500 μ L de isopropanol. Posteriormente se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g, 8 minutos en frío. Por último, se lavó con etanol al 70% y, tras otra centrifugación, se dejó secar al aire y se disolvió en 50 μ L de agua tratada con DEPC.

5.5.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

La síntesis de cDNA a partir de ARN total se realizó después del tratamiento con DNasa, para lo cual se incubó el ARN obtenido con 100 μ L de tampón de la enzima (2X) (Tris HCl 20 mM, MgCl₂ 20 mM), 1 μ L de inhibidor de RNasas (40 U/ μ L; Roche) y 4 μ L de DNasa (10U/ μ L; Roche) a 37°C durante 20 minutos. Tras inactivar la DNasa a 4°C, se purificó el ARN libre de DNA mediante fenolización y se precipitó con etanol.

La transcripción reversa se realizó mezclando, en hielo, 5 μ g de ARN total y 0.5 μ L de cebadores de secuencia aleatoria (Promega). Esta mezcla se desnaturalizó a 70°C, 10 minutos y se dejó de nuevo en hielo. Posteriormente se añadió 5 μ L del tampón de la transcriptasa inversa (5X), 2 μ L de dNTP (5 mM), 2 μ L de la enzima MMLV (Promega) y hasta 12 μ L de agua DEPC libre de RNasas. Se incubó la mezcla 1.5 h a 37°C. Tras parar la reacción a 70°C, 10 minutos, el cDNA quedó preparado. Lo conservamos a -20°C.

La amplificación del cDNA se realizó como se ha descrito en el apartado 5.2.4. En concreto, para la amplificación de los genes humanos *mybbp1a*, *slk*, *cinp*, *atx*, *brcaa1*, *ppp1ca* y β -actina, utilizamos los siguientes cebadores:

	Iniciador directo	Iniciador reverso
MYBBP1A	5'-AACAGGAGCAGGACCTTCTGCAC-3'	5'-TGACCTTTGCTAGGACCTGGCC-3'
SLK	5'-AAATGGCTGAGATAGAACCACC-3'	5'-GCAGATTTTCAAGCTTGGGCC-3'
CINP	5'-AGACTCTTGGAAGTGAACGCC-3'	5'-ATCCAAGGTGGCCTGCAGTTC-3'
ATX	5'-ATGATCACTTTATCTCTAGTAGCC-3'	5'- ATGCTTGTCTGAATACGAGTTCC-3'
BRCAA1	5'-TATTAACAAACGACCTGTACTTGG-3'	5'-GTTGTGTCATCATCTTTGTCATCC-3'
PPP1CA	5'-CTGAGCCAGCCATTCTTCTGG-3'	5'-GTGCTTGTGGAGGAAGTTGGCC-3'
β-actina	5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3'	5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA-3'

Para la amplificación del cDNA de las distintas variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca* de ratón, utilizamos los siguientes cebadores:

	Iniciador directo	Iniciador reverso
SP0	5' CGGAGCGGCGGCGCCGCCAT 3'	5' GCACATGGAGGCTATTTCTTGGC 3'
SP1	5' AGGAGAGCCAGGCCGGAAGG 3'	5' TGATGTGCTCTGCAGATGAGGTCC 3'
SP3	5'CGGAGCGGCGGCGCCGCCAT 3'	5' GGGGTGTGGTAATCTCCCCTAATAAG 3'
SP5	5'AGCGGCGGCGCCGCCATGTC 3'	5' GCTCTACCCTCATCTACCTTCCAG 3'
SP6	5'TGTAGTCTTCCCTATGAGCC 3'	5'CTCTGCAGATGAGGTCCAAA 3'

5.5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (Q/RT-PCR).

Pacientes. Tejido normal y tumoral de 20 pacientes con carcinoma de colon, 20 pacientes con carcinoma prostático y 20 pacientes con carcinoma pulmonar se eligieron al azar del banco de tumores del Departamento de Patología del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona, España). Las muestras de biopsias se recogieron de forma rutinaria y se congelaron rápidamente a -80°C inmediatamente después de su extracción. Todos los tumores fueron histológicamente examinados para confirmar el diagnóstico. Todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Vall d'Hebron.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El RNA total fue extraído del tejido normal y tumoral con el mini kit RNAeasy (Qiagen, Hilden, Germany). El kit de RNA nano Lab Chip (Agilent, Palo Alto, CA) se utilizó para cuantificar y determinar la integridad del RNA total aislado. La síntesis del cDNA se realizó utilizando cebadores al azar con transcriptasa reversa SuperScriptTM II (Invitrogen, Carlsbad, CA) y las alícuotas fueron guardadas a -20°C .

Para determinar la expresión de los genes se utilizó la tecnología RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La cuantificación se hizo con un termociclador ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los datos fueron analizados con un software de detección de secuencias. El programa de PCR consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y 50 ciclos a 95°C durante 15 segundos; la hibridación y la polimerización se produjo a 60°C, durante 1 minuto.

Los cebadores y la sonda Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) para analizar los genes tienen las siguientes referencias: para L6, Hs00735485; para S16, Hs00831691; para S20, Hs00828752 y para PPP1CA, Hs00267568-m1.

Para normalizar las variaciones en la cantidad de cDNA de muestras diferentes se utilizó la ciclofilina (ref. 4326316E), un control endógeno. Cada reacción se hizo por triplicado con cDNA de tejido normal y tumoral de cada paciente estudiado. Se introdujo en cada experimento una muestra de control negativo (sin cDNA). Y se realizó una extracción al azar de tejido original de algunas muestras para confirmar que se obtenían resultados reproducibles de cada PCR cuantitativa en tiempo real (datos no mostrados).

5.5.4. Northern blot.

El ARN total se extrajo usando RNeasy (Qiagen/Biotecx). Las muestras (10 µg) de ARN total se cargaron en geles de formaldehído-agarosa y se transfirieron por capilaridad con solución 10x SSC [SSC 20x: cloruro sódico 3M, citrato sódico 0.3M, pH 7] a membranas Hybond (Amersham). Las membranas se hibridaron con sondas marcadas con ³²P, específicas para cDNA de PAI-1 de ratón (Serrano et al., 1997), o específicas para MYBBP1A, ATX, BRCA1, SLK o CINP, generándolas en el caso de estos 5 últimos mediante PCR en la que usábamos como molde el vector pMaRX-IV que contenía los fragmentos antisentido contra cada uno de ellos y cebadores específicos para el pMaRX-IV (DIR: 5'-CTTGGTACCGAGCTCGGA-3' y REV: 5'-CTAGCTTGCCAAACCTAC-3'). Para confirmar que había la misma cantidad de ARN en cada calle, se usó una sonda específica para GAPDH (usando los cebadores DIR: 5'-AAGGTCGGTGTGAACGGATT-3' y REV: 5'-TTGCTGGGGTGGGTGGTC-3'). En el caso de PPP1CA usamos los siguientes cebadores DIR: 5'-GTATGGGCAGTTCAGCGGCCTG-3' y REV: 5'-GCTGTGTGTTCCCCGTGACG-3', para generar una sonda específica contra una

secuencia que no tuviera homología con las isoformas beta o gamma. Cuando generábamos la sonda a partir de los cebadores para el pMaRX-IV y del vector pMaRX-IV conteniendo el fragmento antisentido contra *ppp1ca*, obteníamos una sonda con cierta homología con las tres isoformas (alfa, beta y gamma), de PP1.

Después, la sonda fue purificada para eliminar nucleótidos radiactivos libres con una columna de filtración en gel NickTM G-50 de sefarosa (Amersham), fue desnaturalizada durante 5 minutos a 95°C, y tras 3 min en hielo, se añadió a la solución de hibridación. La hibridación se hizo durante la noche a 62°C. Después, la membrana se lavó a 62°C dos veces con 2x SSPE, 0.1% SDS; una con 1x SSPE, 0.1% SDS y una más con 0.2x SSPE, 0.1% SDS. Finalmente la membrana se expuso sobre un film (Biomax MS, Kodak).

[20x SSPE: 200 mL de Na₂HPO₄ en agua bidestilada, pH 7.7 con HCl; 210 g de NaCl; 40 mL de 0.5 M EDTA; agua bidestilada hasta completar 1L de volumen final].

5.5.5. Hibridación de matrices de cDNA.

Prehibridamos las membranas con las matrices de muestras pareadas de cDNA de tejido sano y tumoral de diversos pacientes (Cancer Profiling Array, BD Biosciences) con la solución de hibridación ExpressHyb durante 4h a 65°C. La sonda apropiada fue marcada mediante PCR con redivue dCTP³² (Amersham). En concreto, para la amplificación de los genes humanos *mybbp1a*, *slk*, *cinp*, *atx*, *brcaa1* y *ppp1ca*, utilizamos los siguientes cebadores (también usados en el método de la RT-PCR):

	Iniciador directo	Iniciador reverso
MYBBP1A	5'-AACAGGAGCAGGACCTTCTGCAC-3'	5'-TGACCTTTGCTAGGACCTGGCC-3'
SLK	5'-AAATGGCTGAGATAGAACCACC-3'	5'-GCAGATTTTCAAGCTTGGGCC-3'
CINP	5'-AGACTCTTGGAAGTGTAAAGCC-3'	5'-ATCCAAGGTGGCCTGCAGTTC-3'
ATX	5'-ATGATCACTTTATCTCTAGTAGCC-3'	5'- ATGCTTGTGCAATACGAGTTCC-3'
BRCAA1	5'-TATTAACAAACGACCTGTACTTGG-3'	5'-GTTGTGTCATCATCTTTGTCATCC-3'
PPP1CA	5'-CTGAGCCAGCCATTCTTCTGG-3'	5'-GTGCTTGTGGAGGAAGTGGCC-3'

En el caso de las proteínas ribosomales, la sonda apropiada fue marcada mediante PCR con redivue dCTP³², usando cebadores de pMaRX-IV y como molde el vector pMaRX-IV conteniendo el fragmento antisentido contra cada proteína ribosomal analizada.

Después, la sonda fue purificada para eliminar nucleótidos radiactivos libres con una columna de filtración en gel NickTM de sefarosa G-50 (Amersham), fue desnaturalizada durante 5 minutos a 95°C, y tras 3 min en hielo, se añadió a la solución de hibridación. La hibridación se hizo durante la noche a 62°C. Después, la membrana se lavó a 62°C dos veces con 2x SSPE, 0.1% SDS; una con 1x SSPE, 0.1% SDS y una más con 0.2x SSPE, 0.1% SDS. Finalmente la membrana se expuso sobre un film (Biomax MS, Kodak).

Como control, se utilizó el mismo procedimiento, pero usando una sonda generada para hibridar específicamente el cDNA de la ubiquitina. El marcaje en este caso se llevó a cabo por el método del cebador al azar, que consiste en hervir el cDNA (en este caso de ubiquitina) para separar las dos hebras, y añadir una mezcla de cebadores que anillan al azar, enzima Klenow, una mezcla de dNTPs (sin C) y dCTP³². Tras 1h de reacción a 37°C, la sonda se purificó y se siguió el mismo protocolo que con el marcaje por PCR.

5.6. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA.

5.6.1. Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como su procedencia, especie, tipo (monoclonal o policlonal), y diluciones empleadas se detallan en la tabla siguiente:

Anticuerpo primario	Mw (kDa)	Proveedor y referencia	Dilución
p21 (policlonal conejo)	21	Santa Cruz Biotechnology sc-397	1:500
pRb G3-245 (monoclonal ratón)	110-116	BD Pharmingen 554136	1:400
α-tubulina (monoclonal ratón)	55	Sigma T9026	1:10000
Bax (N-20) (policlonal conejo)	23	Santa Cruz Biotechnology sc-493	1:1000
p53 (FL-393) (policlonal conejo)	53	Santa Cruz Biotechnology sc-6243	1:1000
PPP1CA (policlonal conejo)	38	Calbiochem 539517	1:750
Anticuerpo secundario		Proveedor y referencia	Dilución
conejo anti-ratón (monoclonal)		Promega W402B	1:4000
cabra anti-conejo (policlonal)		Calbiochem 401315	1:2500

5.6.2. Extracción de proteína total.

Las células se lavaron con PBS dos veces, y se añadió sobre ellas un volumen apropiado de tampón de lisis. Se recogieron los lisados, en hielo, y se echaron a un tubo de 1.5 mL. Los restos de debris celular se eliminaron por centrifugación a 13200 rpm durante 10 minutos, a 4°C, y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a -80°C. A veces, para mejorar la detección de proteínas nucleares, fue necesaria la incubación durante 1min en baño de ultrasonidos, como paso previo a la centrifugación. La cuantificación de los extractos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albúmina sérica (BSA).

Tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NP-40 1%, NaCl 150 mM. Además añadimos un inhibidor general de fosfatasas: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20mM; un inhibidor de serín treonín fosfatasas, NaF 100 mM; un inhibidor de tirosín fosfatasas, Na_3VO_4 2mM, e inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biochemicals).

5.6.3. Western blot.

La inmunodetección de proteínas sobre membranas de PDVF (Immobilon-P, Millipore) o nitrocelulosa (Hybond ECL; Amersham) se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. En primer lugar, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar, entre 6-15%) en presencia de SDS, utilizando el sistema Mini-Protean 3 (BioRad).

Después de determinar la cantidad apropiada de proteína, la muestra se disolvió en *tampón de carga* (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoethanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma)) y se desnaturalizó durante 5 minutos a 100°C. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS 7.5–15% en tampón de electroforesis (5X: Tris HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5%). Y se transfirieron a membranas de PDVF o nitrocelulosa, según el caso, utilizando un equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 200 mA durante 2h en *tampón de transferencia* (TrisHCl 0.025 M, glicina 0.2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 1 h en agitación. El tampón de bloqueo contenía TBS, 0.1% Tween20 y 1% de BSA o 2.5% de leche en polvo desnatada. Se incubaron sucesivamente con la dilución adecuada de anticuerpo

primario y una dilución de 1:2500-1:4000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (ambos diluidos en tampón de bloqueo). La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y la visualización, con películas Kodak-X-Omat LS (Kodak).

5.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL POR MEDICIÓN DE LUCIFERASA DUAL.

Para valorar si los fragmentos antisentido alteraban la actividad transcripcional de p53, medimos la expresión de un gen reportero bajo un promotor que responde a p53, coexpresándolo ectópicamente con los fragmentos antisentido y con p53.

Con esa finalidad, las células H1299 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante 24 horas a 37°C. Tras ese tiempo, se les cambió el medio y 2 horas más tarde las células se transfectaron transitoriamente con los DNAs apropiados usando el protocolo por precipitación con fosfato cálcico.

Cada pocillo se cotransfectó con:

- ✓ 2 µL de pGL3.Bax (o pGL3.p21): gen de la luciferasa de luciérnaga bajo los promotores de Bax o p21.
- ✓ 0.5 µL de un plásmido con el cDNA de p53 bajo un promotor LTR.
- ✓ 4 µL de los vectores pMaRX-IV conteniendo los distintos fragmentos antisentido (o vector pMaRX-IV vacío o pCOC-Mdm2, en el caso de los controles).
- ✓ 2 µL de pHRG-TK-*Renilla*: gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control de un promotor constitutivamente activo de timidina kinasa.

También teníamos pocillos control negativo que no llevaban plásmido con p53, sino que fueron cotransfectados con pGL3.bax, pHRG-TK-*Renilla* y pMaRX-IV vacío hasta completar la misma cantidad de DNA total que los demás; y otro pocillo transfectado con GFP para seguimiento de la eficiencia de transfección.

16 horas tras la cotransfección, se les dio un choque de glicerol a las células (DMEM suplementado con 10% glicerol) durante 1 min. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS, se les añadió medio fresco y se cultivaron a 37°C.

48 horas después de la cotransfección, las células se lisaron y se expusieron a distintos sustratos que son procesados por cada una de las luciferasas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega). Es decir, las células se lisaron con 500 μ L del tampón de lisis pasivo 1x y se transfirió el lisado de cada pocillo, a un eppendorf de 1.5 mL. Los lisados se centrifugaron 30'' a 13200 rpm y a 4°C. Se pusieron 20 μ L del sobrenadante de cada muestra en pocillos de una placa opaca de 96. La actividad de la luciferasa de luciérnaga se midió con la adición de 50 μ L del sustrato de esa luciferasa por el robot Victor II (PerkinElmer, Wallac Oy). A continuación, la actividad de la luciferasa de *Renilla* se midió con la adición de 50 μ L del reactivo Stop & Glo, por el Victor II. La actividad relativa de la luciferasa de luciérnaga fue normalizada respecto a la de la luciferasa de *Renilla* en cada caso para evitar disparidad de resultados debidos a la distinta eficiencia de transfección entre muestras. Cada transfección se repitió por triplicado y se calculó la media y la desviación estándar.

Con los MEFs p53^{-/-};mdm2^{-/-}, el protocolo seguido fue muy parecido, salvo porque en ese caso se usó el reactivo JetPEITM como agente de transfección, siguiendo las indicaciones del fabricante (Polyplus-transfection).

Además, en este caso trabajábamos con poblaciones celulares transducidas previamente con fragmentos antisentido de S9, S16, L6, L13, S20 o L4; con el gen de E6, o sin nada (control).

En este caso, cada pocillo se cotransfectó con los siguientes DNAs:

- ✓ 1.5 μ L de pGL3.Bax: gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de Bax.
- ✓ 1.15 μ L de un plásmido con el ARNm completo de p53, incluyendo las zonas no codificantes 5' y 3'.
- ✓ 1.5 μ L de phRG-TK-*Renilla*: gen de la luciferasa de *Renilla* bajo el control de un promotor constitutivamente activo de timidina kinasa.

También teníamos pocillos control negativo que no llevaban plásmido con p53, sino que fueron cotransfectados con pGL3.bax, phRG-TK-*Renilla* y pMaRX-IV vacío hasta completar la misma cantidad de DNA total que los demás; y otro pocillo transfectado con GFP para seguimiento de la eficiencia de transfección.

Las células se lisaron y se expusieron a distintos sustratos que son procesados por cada una de las luciferasas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega), exactamente igual que con las células H1299.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. GENERACIÓN DE FIBROBLASTOS DIANA DONDE REALIZAR EL RASTREO GENÉTICO.

Usando un vector retroviral que contiene el cDNA de la proteína mutante temperatura-sensible (p53^{val135}, tsp53) de p53 para expresar condicionalmente p53 en MEFs p53^{-/-}, establecimos una línea celular **p53^{-/-};ts** a partir de la población infectada. De forma similar, expresamos tsp53 en MEFs doblemente negativos para p53 y p21 (**p53^{-/-};p21^{-/-};ts**). Estas líneas celulares se infectaron además con un vector retroviral que contenía el oncogén *ras* (*Val12-ras*), generando las líneas celulares **p53^{-/-};ts-ras** y **p53^{-/-};p21^{-/-};ts-ras** respectivamente (Tabla 2). Estas líneas celulares se establecieron y mantuvieron a la temperatura restrictiva (39°C) para evitar la selección contra p53 o componentes de la vía de p53. Como líneas celulares control infectamos células parentales nulas para p53 con el oncogén *ras* (**p53^{-/-};ras**) y las mantuvimos en las condiciones citadas anteriormente.

LÍNEA CELULAR	GENOTIPO	FENOTIPO
p53^{-/-}	MEFs p53 ^{-/-}	Crecimiento a 39°C y 32°C
p53^{-/-};ras	MEFs p53 ^{-/-} con ras ^{val12}	Crecimiento a 39°C y 32°C
p53^{-/-};ts	MEFs p53 ^{-/-} con p53 ^{val135}	Crecimiento a 39°C, parada reversible a 32°C
p53^{-/-};p21^{-/-};ts	MEFs p53 ^{-/-} ;p21 ^{-/-} con p53 ^{val135}	Crecimiento a 39°C, parada reversible a 32°C
p53^{-/-};ts;ras	MEFs p53 ^{-/-} con p53 ^{val135} y ras ^{val12}	Crecimiento a 39°C, parada terminal a 32°C.
p53^{-/-};p21^{-/-};ts;ras	MEFs p53 ^{-/-} ;p21 ^{-/-} con p53 ^{val135} y ras ^{val12}	Crecimiento a 39°C, parada terminal a 32°C.

Tabla 2: Caracterización de las líneas celulares usadas en el rastreo genético. Se muestra el genotipo de las líneas celulares generadas, así como su comportamiento a las temperaturas restrictiva (39°C) y permisiva (32°C) para el p53 termosensible.

Para estudiar el efecto de la activación de p53 en estas líneas celulares, examinamos la proliferación a las temperaturas restrictiva (39°C) y permisiva (32°C)

para p53. Las células que expresaban el mutante de p53 temperatura-sensible (**p53^{-/-};ts**, **p53^{-/-};ts-ras**, **p53^{-/-};p21^{-/-};ts** y **p53^{-/-};p21^{-/-};ts-ras**) crecían a 39°C y sufrían una parada del ciclo celular cuando se cambiaban a 32°C, temperatura a la que p53 ts adoptaba su conformación normal, no mutante (Martinez et al., 1991) (Figura 3A). Esta parada del ciclo celular a 32°C era más eficiente en la presencia del oncogén *ras*. Por el contrario, los MEFs parentales **p53^{-/-}** (sin p53val135) o que expresaban *ras* (**p53^{-/-};ras**) no detenían su crecimiento a 32°C, indicando que la parada del ciclo celular que observábamos no era un efecto de la temperatura (Figura 3A).

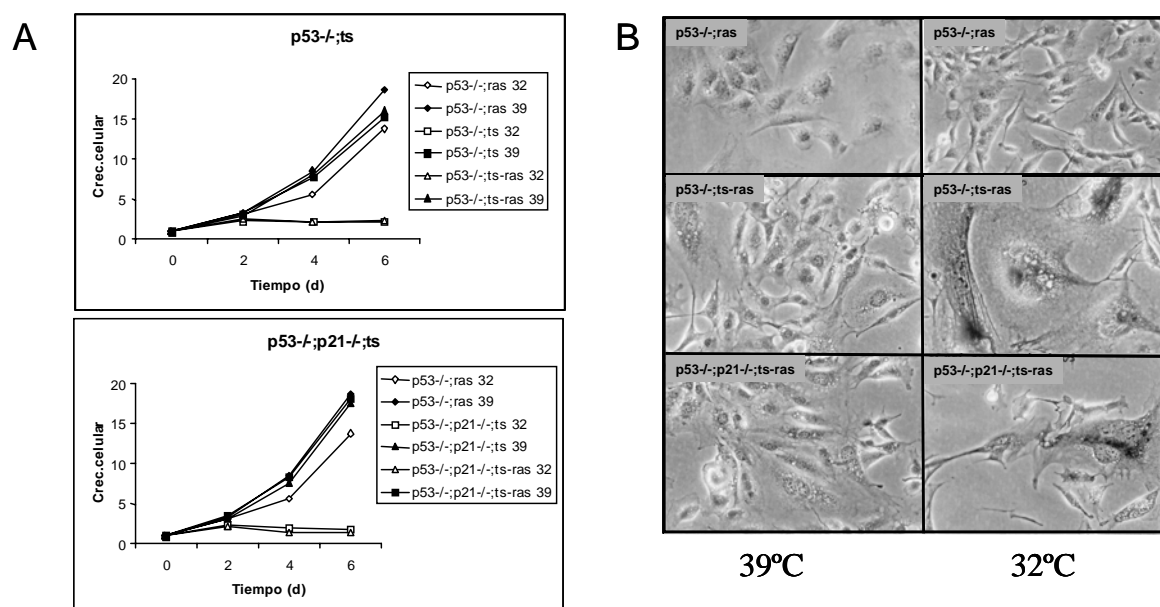


Figura 3: Caracterización de las líneas celulares usadas en el rastreo genético. A) Crecimiento de las líneas celulares a las temperaturas del ensayo. **B)** Aspecto de las líneas celulares a las temperaturas del ensayo.

El oncogén *ras* cambia la habilidad de p53 de inducir parada del ciclo celular reversible a inducir parada del ciclo celular permanente con características de senescencia (Ferbeyre et al., 2002). Dado que *p21Cip1* parece jugar un papel en senescencia celular, y la señalización del oncogén *ras* activa también a *p21Cip1* en células primarias probablemente a través de un aumento de la actividad de p53, la presencia o ausencia de *p21Cip1* podría estar influyendo en el resultado de la cooperación de *ras* y *p53* en la senescencia inducida por oncogenes. Para examinar esta posibilidad, examinamos diferentes marcadores de senescencia a las temperaturas restrictiva y permisiva. Todas las poblaciones celulares infectadas se

cultivaron inicialmente a 39°C, después se cambiaron a 32°C, donde se mantuvieron durante 48 ó 72 horas, y a continuación se analizaron marcadores de senescencia.

Las células **p53^{-/-};ts** que se incubaron a 32°C por dos o más días no mostraron ningún marcador fenotípico de senescencia [(Ferbeyre et al., 2002), y datos no mostrados], aunque estaban claramente detenidas en su crecimiento (Figura 3A). De forma similar, las células **p53^{-/-};ts-ras** mantenidas en ausencia de p53 funcional, a 39°C, no mostraron características de senescencia (Figura 3B). Sin embargo, las células **p53^{-/-};ts-ras** incubadas a 32°C durante más de dos días mostraban una morfología plana y alargada (Figura 3B). Este fenotipo era indistinguible de la parada con características de senescencia observada en células doblemente negativas para p53 y p21, que expresaban el oncogén *ras*: **p53^{-/-};p21^{-/-}; ts-ras** (Figura 3B).

Para confirmar estos datos, analizamos el porcentaje de células que mostraban actividad β -gal asociada a senescencia. Tanto las **p53^{-/-};ts** como las **p53^{-/-};p21^{-/-};ts** mostraban un pequeño porcentaje de células (en torno al 10%) con actividad SA- β gal tanto a 32°C como a 39°C. Las **p53^{-/-};ts-ras** y las **p53^{-/-};p21^{-/-};ts-ras** muestran un fondo similar a la temperatura restrictiva; sin embargo, cuando se cambiaron a 32°C durante más de dos días, acumularon células con actividad β -gal asociada a senescencia hasta llegar a un 80% después de cuatro días (Figura 4A).

Una confirmación adicional de que el fenotipo observado estaba asociado a senescencia, se obtuvo del análisis de la expresión del ARNm de PAI-1. Se ha demostrado que éste es un marcador específico asociado a senescencia (Kortlever et al., 2006; Serrano et al., 1997). Después de dos días a 32°C, las células **p53^{-/-};ts** y **p53^{-/-};p21^{-/-};ts** no mostraban expresión de este marcador, indicando que la parada del crecimiento inducida solamente por p53 es un fenotipo diferente de la parada en senescencia. Sin embargo, las células **p53^{-/-};ts-ras** y **p53^{-/-};p21^{-/-};ts-ras** cambiadas a 32°C expresaban ARNm de PAI-1 (Figura 4B), confirmando la especificidad del fenotipo provocado por la cooperación entre p53 y ras. Estos datos sugieren que p21 no se requiere en la cooperación *p53-ras* para la inducción de la senescencia celular.

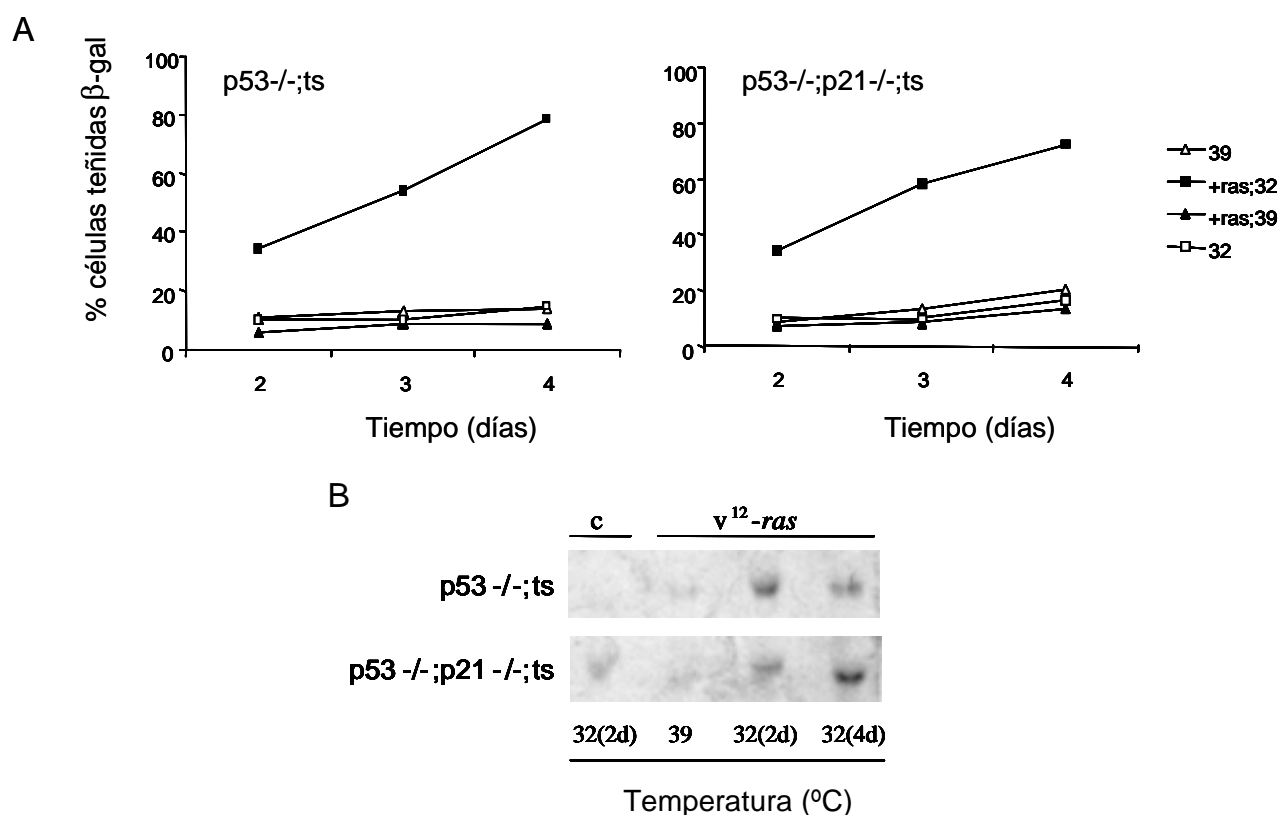


Figura 4: Análisis de marcadores de senescencia en las líneas celulares usadas en el rastreo genético. A) Porcentaje de células que mostraban actividad β -gal asociada a senescencia. **B)** Expresión del ARNm de PAI-1 mediante Northern blot.

Se ha publicado que en presencia del oncogén *ras*, la parada del crecimiento inducida por *p53* es irreversible incluso si la población se cambia a la temperatura restrictiva de nuevo (Ferbeyre et al., 2002). Para estudiar si *p21Cip1* tiene un papel en esta parada irreversible, todas las poblaciones celulares se cultivaron inicialmente a 39°C, se cambiaron a 32°C (durante dos o cuatro días), y después se volvieron a cultivar a 39°C. La proliferación celular se controló después de una vuelta a 39°C (día 0). Los porcentajes de células **p53^{-/-};ts** y **p53^{-/-};ts-ras** cultivadas a 39°C y nunca incubadas a 32°C (día 0) eran similares (Figura 3A). La incubación de estas células a 32°C condujo a una parada del ciclo celular (Figura 3A). La incubación de las células **p53^{-/-};ts-ras** durante dos o cuatro días a 32°C disminuyó dramáticamente su habilidad para restablecer el crecimiento tras la vuelta a 39°C, comparado con el

control **p53-/-;ts** (Figura 5A). Estos datos concuerdan con lo publicado por otros autores (Ferbeyre et al., 2002), excepto porque tras un tiempo más corto (dos días) a la temperatura permisiva, nuestros cultivos son incapaces de reentrar en proliferación. Para estudiar la relevancia de *p21Cip1* en esta parada irreversible, llevamos a cabo el mismo protocolo de rescate con los cultivos nulos para p21: las líneas celulares **p53-/-;p21-/-;ts** y **p53-/-;p21-/-;ts-ras**. Las células **p53-/-;p21-/-;ts-ras** no recuperaron el crecimiento después de dos días de permanencia a 32°C, mientras que la población de células que no expresaba el oncogén *ras* (**p53-/-;p21-/-;ts**) reentró en el ciclo celular una vez cambiada a la temperatura restrictiva (Figura 5A). Por tanto, la ausencia de p21 no alteró la capacidad de reincorporación al ciclo celular tras una vuelta a 39°C.

Para cuantificar el potencial de crecimiento a largo plazo de las células tras un cambio de 32°C a 39°C, usamos un ensayo clonogénico. Este ensayo mide la capacidad de proliferación de una célula basada en su capacidad de formar colonias después de ser sembradas a baja densidad. Se sembraron 1000 células en placas de 10 cm de diámetro y se mantuvieron a 39°C por 24 horas, después se cambiaron a 32°C por 2 días. Las células se cambiaron nuevamente a 39°C y se dejaron crecer durante 10 días. La eficiencia de siembra de las células **p53-/-;ts** y **p53-/-;p21-/-;ts** a 39°C (es decir, nunca incubadas a 32°C) fue en torno al 20% en ambos casos y no se alteró por la expresión de *ras*. Por el contrario, las células **p53-/-;ts-ras** y **p53-/-;p21-/-;ts-ras** perdieron la habilidad de formar colonias cuando se incubaron durante más de 2 días a 32°C (Figura 5B). Las células sembradas a densidad clonogénica a 32°C no formaron colonias (datos no mostrados). Es importante resaltar que las diferencias en el potencial clonogénico entre estas poblaciones celulares no era debido a diferencias en la habilidad para adherirse a las placas a baja densidad, ya que contamos un número similar de células adheridas 24 horas tras la siembra (datos no mostrados).

Concluimos que el oncogén *ras* transmite señales que perjudican el rescate de una parada de ciclo celular mediada por *p53*, y que esta propiedad es independiente de *p21Cip1*.

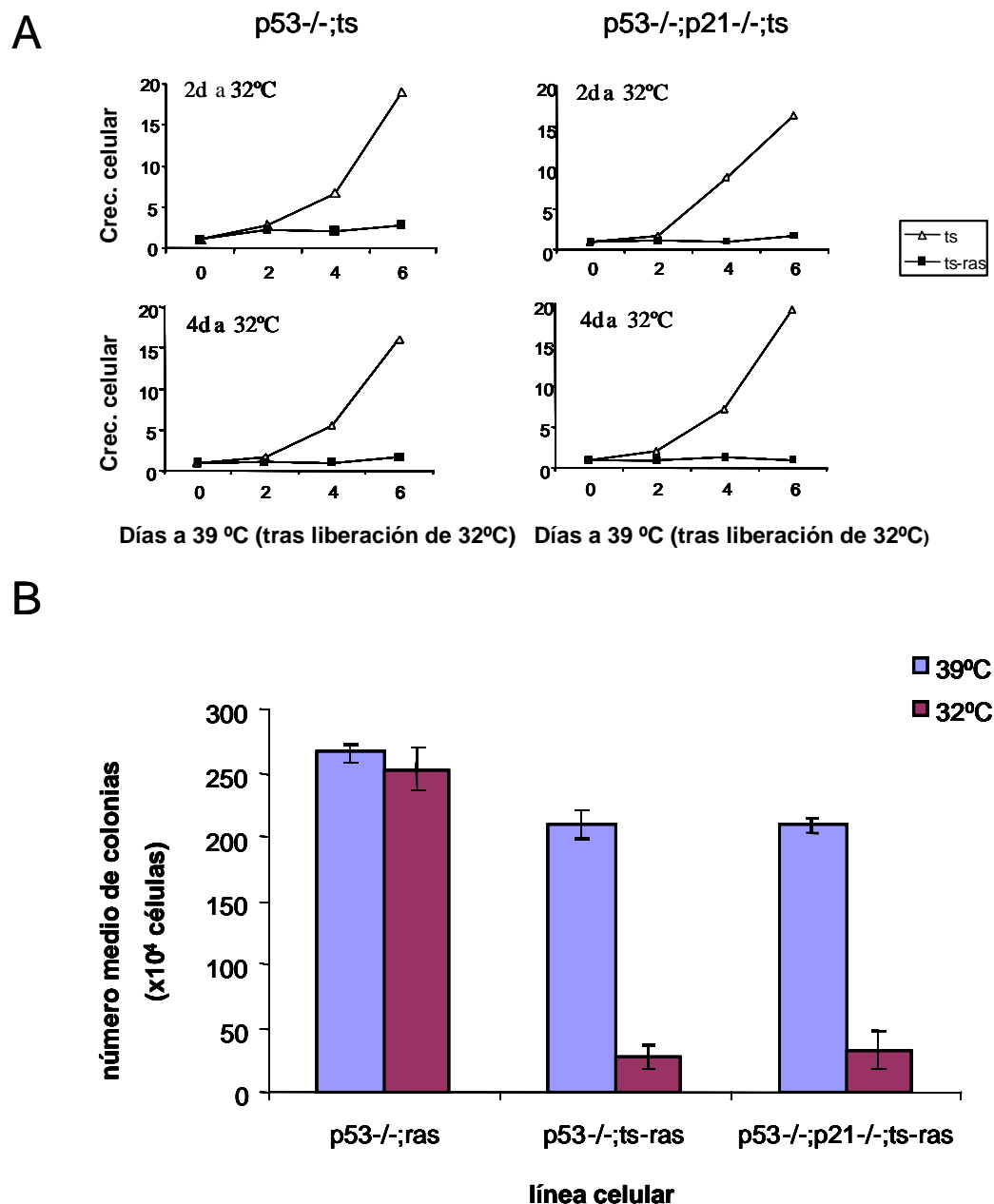


Figura 5: Capacidad de crecimiento de las distintas líneas celulares tras un periodo a 32°C. A) Protocolo de rescate, a 39°C, tras 2 ó 4 días a 32°C. B) Ensayo clonogénico, para valorar el potencial de proliferación a largo plazo de las células, sembrándolas a baja densidad tras un periodo previo a 32°.

6.2. RASTREO GENÉTICO.

Éste se realizó en la línea **p53^{-/-};p21^{-/-};ts-ras**, caracterizada anteriormente, usando el sistema retroviral MaRX (Carnero et al., 2000; Hannon et al., 1999). Con objeto de identificar genes cuya ausencia de función producía la abolición de la parada celular inducida por *p53* y *ras* a la temperatura permisiva, la línea fue

infectada con una librería de fragmentos antisentido clonados en el vector retroviral pMaRX-IV. (Figura 6A).

Este tipo de vectores permite una elevada eficacia de infección y expresión del transgén, produciendo expresiones estables a partir de un promotor CMV incluido en su arquitectura. Además, los vectores retrovirales del sistema MaRX incorporan la secuencia LoxP en el 3'LTR. Tras la integración se produce una duplicación del LTR así como de la secuencia LoxP. Esta secuencia queda así flanqueando el provirus, y tras la expresión de recombinasa CRE, se escinde del genoma produciendo un sistema de expresión condicional. Alternativamente, el provirus puede ser escindido por una reacción CRE *in vitro*, produciendo un plásmido que puede ser secuenciado o utilizado directamente en otras infecciones, ya que retiene su capacidad de producir virus en células competentes.

De esta forma se rescataron clones que contenían fragmentos antisentido capaces de evadir el fenotipo de parada de crecimiento inducido por p53 ts a 32°C. Se analizó el ADN genómico procedente de los clones identificados en el rastreo, cada uno conteniendo integrado un fragmento antisentido diferente y presumiblemente capaz de abolir la parada celular inducida por p53. Tras la escisión de los provirus por una reacción CRE *in vitro*, éstos fueron rescatados transformando bacterias DH10B-lac-trfA supercompetentes.

Tras un análisis por PCR que nos permitía discernir los vectores pMaRX-IV vacíos de los que contenían algún fragmento antisentido, se secuenciaron y se compararon dichas secuencias en las bases de datos (NCBI, Blast).

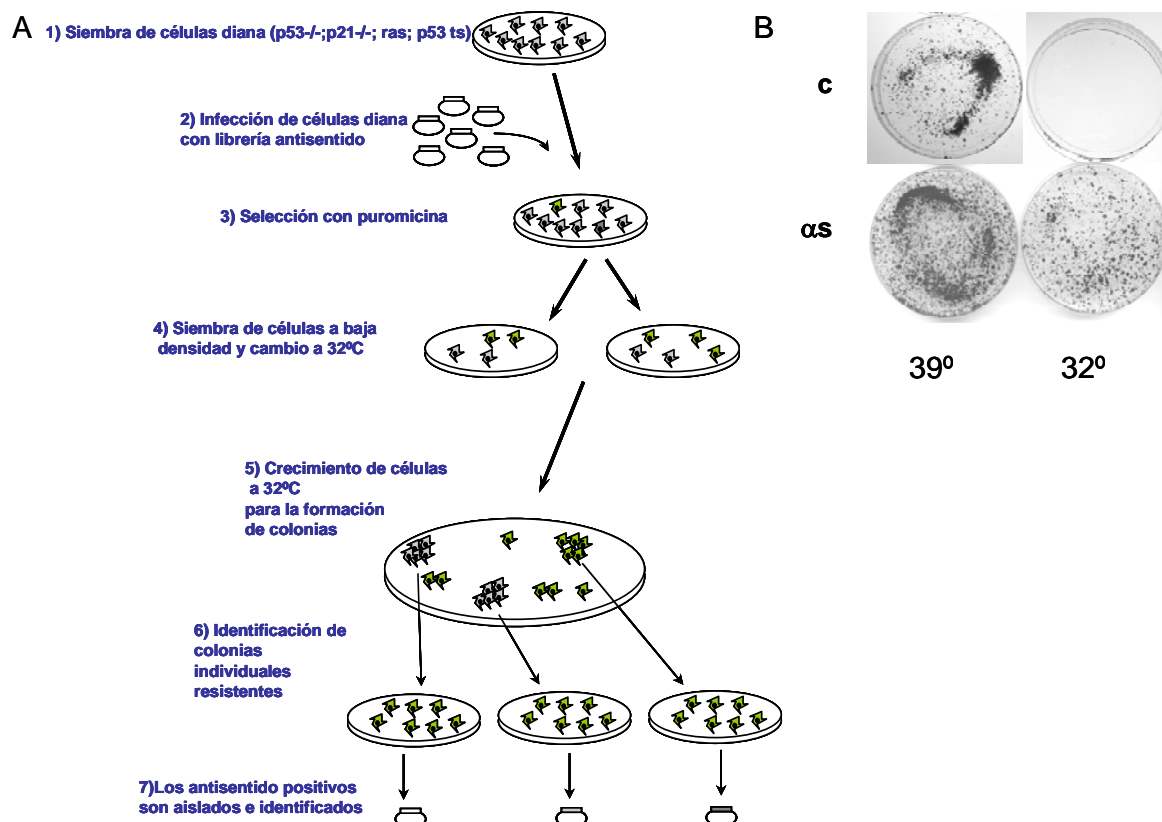


Figura 6: Rastreo genético. A) Esquema del protocolo seguido en el rastreo genético primario. B) Verificación secundaria del efecto de los antisentidos identificados, en la evasión de la parada celular inducida por p53. 6×10^4 células p53^{-/-};ts se incubaron a la temperatura restrictiva (39°) o permisiva (32°) durante una o dos semanas respectivamente. A continuación las células fueron fijadas con gutaraldehído al 0.5% y teñidas con cristal violeta al 1% para visualizar el crecimiento de colonias. Se muestra el efecto de un fragmento antisentido a modo de ejemplo. c: vector vacío; αs: vector con un fragmento antisentido.

6.2.1. Resultados primarios del rastreo genético.

Entre los 245 fragmentos antisentido identificados se encuentran genes de función conocida, fragmentos de función desconocida y otros no identificados en la base de datos. (Figura 7).

Entre los genes de función conocida, recuperamos dos fragmentos diferentes contra el propio p53. Estos fragmentos antisentido se localizan en una determinada región que ha sido anteriormente descrita como eficiente en el silenciamiento génico de p53 por ARN antisentido (Carnero et al., 2000). Estos fragmentos representaban una validación de nuestro rastreo genético.

6.2.2. Verificación secundaria del efecto de los fragmentos antisentido.

En este tipo de rastreos genéticos es fundamental chequear que los positivos lo son verdaderamente. Para ello recuperamos plásmidos retrovirales a partir de las bacterias transformadas con 125 de los clones antisentido identificados, con el fin de verificar el efecto en la línea celular **p53^{-/-}; ts**.

Para el chequeo sembramos dos placas a partir de cada clon **p53^{-/-};ts** infectado con un fragmento antisentido determinado. Ambas contenían 6×10^4 células. Se incubaron una a 39°C (temperatura restrictiva para el mutante de p53 Ts) y la otra a 32°C (temperatura permisiva). Tras dejarlas crecer una o dos semanas respectivamente, se comparó el número de colonias entre cada placa a 39°C y su placa hermana a 32°C, para calcular el porcentaje de evasión del efecto de parada del crecimiento celular, ocasionado por cada fragmento antisentido. Simultáneamente, y como control negativo, poníamos el mismo experimento a partir de células **p53^{-/-};ts** que no estaban infectadas con ningún fragmento antisentido. (Figura 6B). 95 fragmentos superaron esta validación secundaria, ya que fueron capaces de inducir crecimiento celular a la temperatura permisiva, evadiendo la parada de ciclo celular inducida por p53 que se observaba en la placa control sin infectar por fragmentos antisentido. El porcentaje de evasión de los distintos fragmentos positivos oscilaba entre un 10 y un 40% sobre el crecimiento del control negativo. La diferente eficiencia de los fragmentos antisentido puede atribuirse a muchos aspectos, tales como la afinidad de los antisentidos por sus ARNm dianas o a la contribución relativa que cada uno de esos genes tiene en la parada de ciclo celular inducida por p53. Como analizamos grupos de células infectadas con título viral similar, asumimos que los niveles de expresión de los distintos fragmentos no variaban significativamente entre los distintos casos.

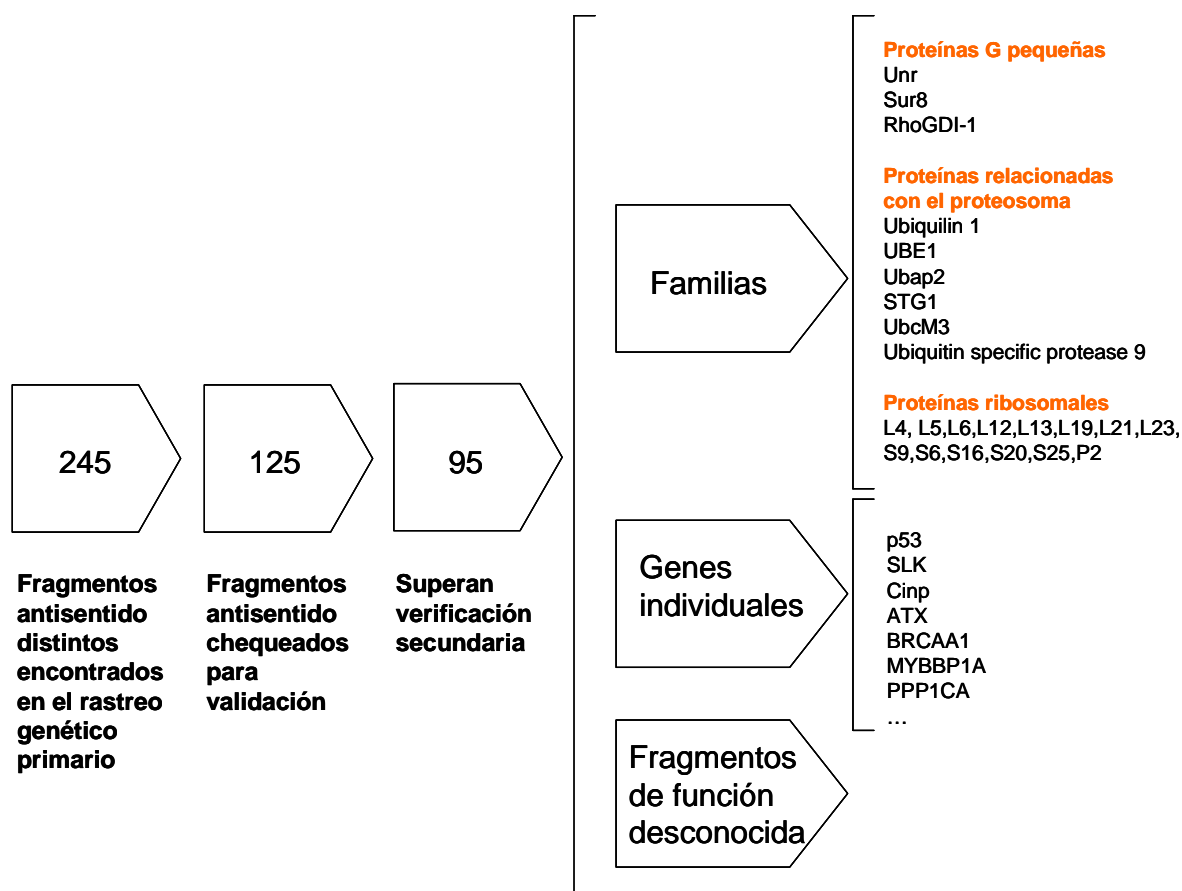


Figura 7: Esquema-resumen de los resultados obtenidos en el rastreo genético. De los fragmentos antisentido encontrados en el rastreo genético primario, chequeamos aproximadamente la mitad para validación. Aproximadamente el 75% de los genes chequeados superaron la verificación secundaria. Entre estos se encontraban familias de genes, genes individuales y fragmentos de función desconocida.

6.2.3. Análisis del tamaño y localización de los fragmentos antisentido positivos.

Entre los genes que se correspondían con los fragmentos antisentido que superaron la verificación secundaria, encontramos tanto familias de genes (proteínas G pequeñas, proteínas relacionadas con el proteosoma, proteínas ribosomales...) como genes individuales (el propio *p53*, *slk*, *clnp*, *atx*, *brca1*, *mybbp1a*, *ppp1ca*...) o fragmentos de función desconocida (Figura 7).

El tamaño de los fragmentos antisentido oscilaba entre 46 y 581 pares de bases, siendo el tamaño medio de 146 nucleótidos. (Figura 8A). El 75% de los fragmentos se encontraban por debajo de los 160 nucleótidos; es decir, en torno al

tamaño descrito previamente como el más efectivo en el silenciamiento génico (Carnero et al., 2000).

El análisis de la distribución de los fragmentos antisentido a lo largo de los diferentes ARNm parece indicar que éstos se distribuyen por todo el mensajero, incluyendo las zonas no codificantes 5' y 3'. Además, parecen ser especialmente abundantes en la zona 3' no codificante (Figura 8B).

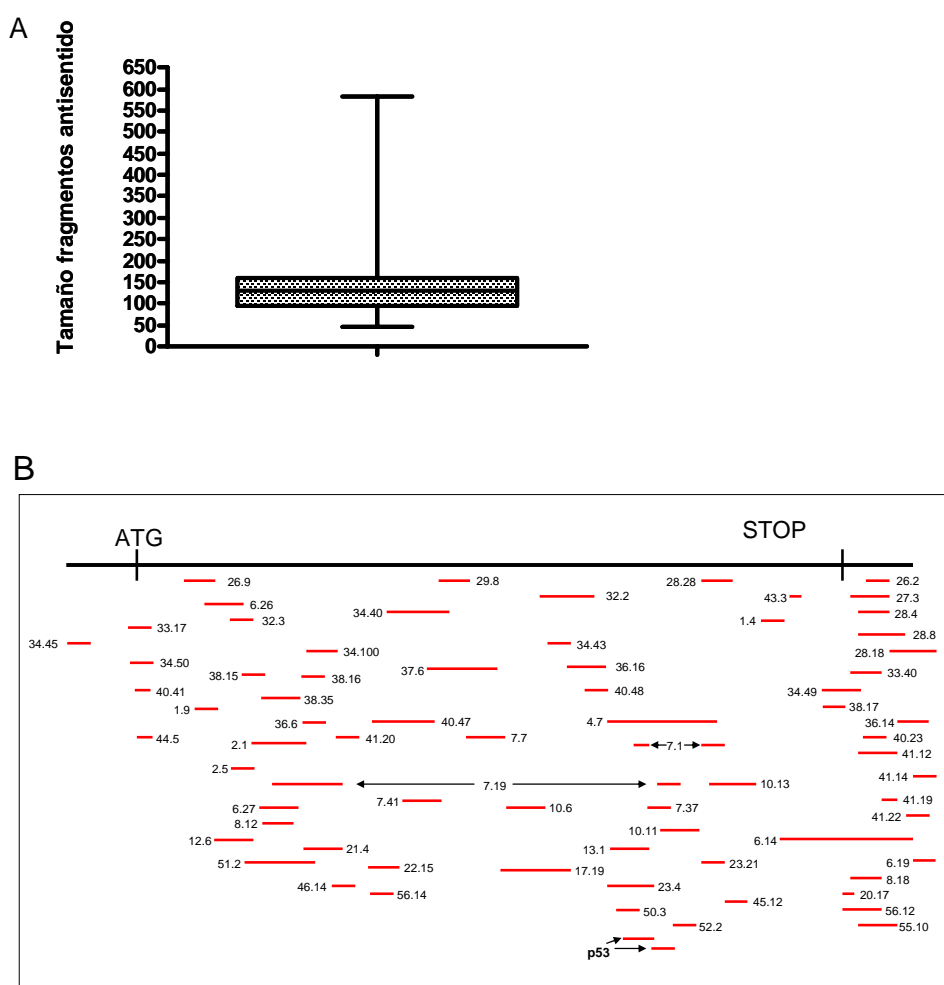


Figura 8: Tamaño y localización general de los fragmentos antisentido. A) La mayoría de los fragmentos antisentido se encontraban en una estrecha franja de tamaño comprendida entre los 94 y los 161 nucleótidos. B) Usando el esquema de un ARNm hipotético, representamos la distribución aproximada de los diferentes fragmentos antisentido con respecto al mismo. El posterior análisis visual parece indicar que éstos se distribuyen por todo el mensajero, incluyendo las zonas no codificantes 5' y 3', siendo especialmente abundantes en la zona 3' no codificante.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE UN GRUPO DE PROTEÍNAS RIBOSOMALES Y p53.

En el rastreo genético primario identificamos un grupo de fragmentos antisentido contra un grupo de proteínas ribosomales (RPs). Recuperamos un total de 15 fragmentos antisentido diferentes, de 14 genes de proteínas ribosomales distintos, entre ellos dos independientes de L6 (Tabla 3), que eran capaces de evadir el efecto de parada de ciclo celular inducido por p53. El tamaño de los fragmentos antisentido oscilaba entre 50 y 300 nucleótidos, siendo 13 de los 14 fragmentos más pequeños de 200 nucleótidos. Los fragmentos se distribuían a lo largo de los ARNm enteros, incluyendo la zona 5' no codificante, como en el caso del fragmento antisentido contra L12.

GEN	CÓDIGO	ANTISENTIDO	TAMAÑO (nt)	LOCALIZACIÓN (desde ATG)	EVASIÓN (p53-/-;ts) (%)*
p53	X01237	34.5 51.23	122 90	792-913 837-926	25+10 _
L4	X82180	45.12	79	1043-1121	24.5+11.5 _
L5	XM203768	43.3	48	794-841	14.5+4.5 _
L6	NM011290	44.5 56.14	64 89	28-91 282-370	45 +12 25.5+13.5 _
L12	XM192893	33.17	80	(-23)-56	23+1 _
L13	XM138057	17.19	293	126-418	17.5+0.5 _
L19	NM009078	34.100	171	78-248	18.9+0.1 _
L21	XM194259	34.3	100	228-327	19+9 _
L23	AF287271	13.1	160	217-376	16.5+1.5 _
S9	AK013903	6.26	150	2-151	40.5+6.5 _
S6	Y00348	7.37	123	494-616	6.0+0.4 _
S16	XM289707	22.15	133	93-225	24+3 _
S20	NM026147	7.41	148	79-226	24+9 _
S25	NM024266	508	107	107-213	18+8 _
P2	BC012413	555	179	(-38)-141	13.7+2.7 _

Tabla 3: Fragmentos antisentido de proteínas ribosomales identificados en el rastreo genético a gran escala.

* El porcentaje de evasión de la parada inducida por p53 se calculó como el porcentaje de colonias que crecían a 32°C con respecto al 100 % de colonias que crecieron a 39°C en el mismo experimento.

Además, todos estos fragmentos superaron la verificación secundaria en la línea celular **p53^{-/-};ts**, induciendo significativamente el crecimiento celular a la temperatura permisiva (Tabla 3), evadiendo parcialmente el efecto de parada de ciclo celular inducido por *p53* y que se observaba en la placa control sin ningún fragmento antisentido. El porcentaje de evasión de los distintos fragmentos (calculado como el porcentaje de colonias que crecen a 32°C respecto al 100% de colonias que crecen a 39°C en el mismo experimento) oscilaba entre un 10 y un 40% sobre el crecimiento del control negativo. Este es un porcentaje significativo dado que fragmentos antisentido contra el propio *p53* inducían un crecimiento del 25% (Tabla 3).

Entre los fragmentos antisentido contra RPs recuperados en nuestro rastreo genético, identificamos L23 y L5, dos RPs que se han relacionadas previamente con la vía de estrés por biogénesis ribosomal y con *p53* (Dai y Lu, 2004; Dai et al., 2004). Este hecho constituye una validación adicional de nuestro rastreo genético.

Para los siguientes experimentos, seleccionamos 6 de las RPs obtenidas en el rastreo genético y cuya relación con esta vía no se había señalado previamente.

6.3.1. Los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales reducen la actividad transcripcional de *p53*.

p53 es un factor de transcripción que se une a DNA y dirige la transactivación de varios genes que ejecutan la parada del ciclo celular (Oren, 2003). Para valorar si los fragmentos antisentido contra RPs alteran la actividad transcripcional de *p53*, medimos la expresión de un gen reportero bajo un promotor que responde a *p53*, coexpresándolo ectópicamente con los fragmentos antisentido de RPs y con *p53*. Con esa finalidad, cotransfectamos células H1299 (que son nulas para *p53*) con tres plásmidos distintos que contenían lo siguiente: el cDNA de *p53* bajo un promotor LTR, el gen de la luciferasa bajo el promotor de *bax* (promotor que responde a *p53*) y los fragmentos antisentido bajo un promotor CMV. Encontramos que casi todos los fragmentos antisentido reducían hasta cierto grado la transactivación dependiente de *p53* del promotor de *bax* (Figura 9A). El vector vacío pMaRX-IV no alteró la actividad de *p53* y, al contrario, la expresión de *mdm2* (como control positivo) redujo la transcripción a niveles basales.

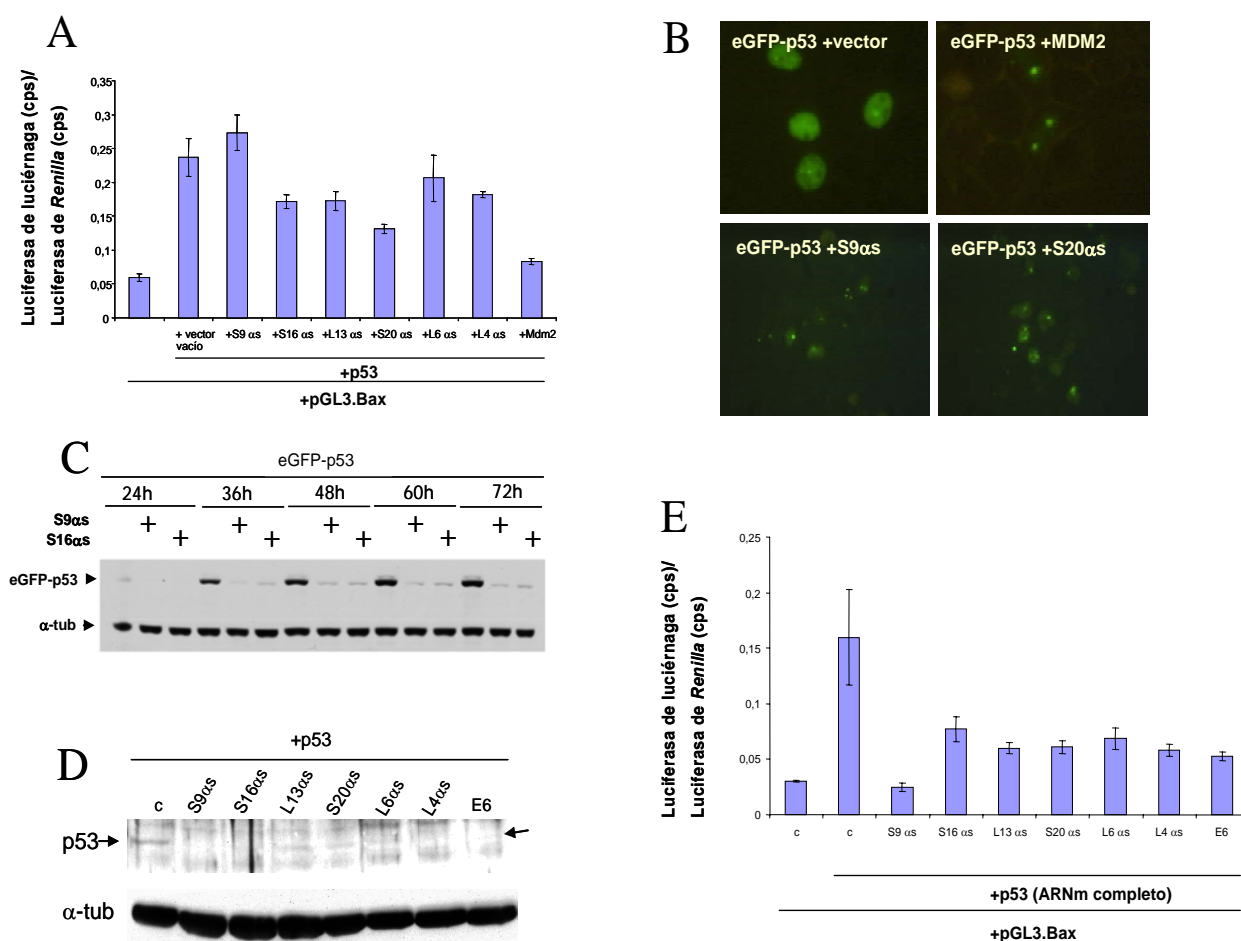


Figura 9: Los fragmentos contra las proteínas ribosomales inhiben la actividad de p53. **A)** La mayoría de los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales inhiben la activación transcripcional inducida por el cDNA de p53. Las células nulas para p53, H1299, se cotransfectaron con un plásmido reportero con el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de bax y un plásmido con el p53 silvestre bajo un promotor LTR. La primera barra se corresponde con células control que se transfectaron con el plásmido reportero (pGL3.Bax) y un plásmido vacío sin p53. Las barras siguientes (de la segunda a la novena) se corresponden con células que se transfectaron además con un plásmido para la expresión constitutiva del fragmento antisentido indicado (o vector vacío y Mdm2 en el caso de los controles) bajo un promotor CMV. La actividad luciferasa dual se midió tal como se indica en el apartado "Materiales y Métodos". **B)** Los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales favorecen la localización nucleolar de p53 y/o su degradación. Las células HEK293 se cotransfectaron transitoriamente con un vector retroviral que codificaba para una proteína de fusión de eGFP en el extremo aminoterminal de la proteína p53 humana, y vectores retrovirales que contenían cada uno de los fragmentos antisentido de las proteínas ribosomales. Las células se cultivaron y, 48 después de la transfección, se chequeó la localización subcelular de eGFP-p53. **C)** Las células HEK293 se cotransfectaron transitoriamente con un vector retroviral que codificaba para una proteína de fusión de eGFP en el extremo aminoterminal de la proteína p53 humana, y vectores retrovirales que contenían cada uno de los fragmentos antisentido de las proteínas ribosomales. Las células se cultivaron durante los tiempos indicados y se chequeó el nivel de p53 mediante Western blot. El efecto de dos de los fragmentos antisentido de las RPs se muestra a modo de ejemplo. **D)** Los fragmentos antisentido contra las RPs inhiben la proteína p53 en células nulas para Mdm2. MEFs doblemente negativos para p53 y mdm2 se infectaron con retrovirus que contenían fragmentos antisentido contra S9, S16, L6, L13, S20 y L4, o el gen E6. Tras la selección adecuada, cada población de células con un fragmento antisentido determinado, con E6, o sin nada (c) se transfectó con un plásmido con el ARNm completo de p53 (Takagi et al, 2005). Tras 48 horas, la proteína total se extrajo y los niveles de p53 se analizaron. **E)** Todos los fragmentos antisentido de RPs inhiben la activación transcripcional inducida por el ARNm completo de p53 en células nulas para Mdm2. MEFs doblemente negativos para p53 y mdm2 se infectaron con retrovirus que contenían fragmentos antisentido contra S9, S16, L6, L13, S20 y L4, o el gen E6. Tras la selección adecuada, cada población de células con un fragmento antisentido determinado, con E6, o sin nada (c) se cotransfectó con un plásmido con el ARNm completo de p53 (Takagi et al, 2005) y un plásmido reportero con el gen de la luciferasa bajo el promotor de bax. La primera barra se corresponde con células control que llevan el plásmido reportero (pGL3.Bax) y un plásmido vacío sin p53. La actividad luciferasa dual se midió tal como se indica en el apartado "Materiales y Métodos".

6.3.2. Los fragmentos antisentido contra las proteínas ribosomales reducen los niveles de p53.

Se ha mostrado recientemente que L11 se une a una región central de Mdm2 y previene la ubiquitinación y degradación de p53 mediada por Mdm2, restableciendo subsecuentemente la transactivación mediada por p53 y la parada del ciclo celular (Zhang et al., 2003). Estos autores sugieren que L11 funciona como un regulador negativo de Mdm2. Por lo tanto, si nuestras proteínas ribosomales actuasen de una forma similar, los fragmentos antisentido contra ellas podrían producir el efecto contrario; es decir, la reducción de las RPs debería permitir un aumento de Mdm2 libre y activo, reduciendo por tanto los niveles de p53.

Se ha descrito que otra proteína ribosomal, L26, actúa de manera distinta. Así, se ha mostrado que L26 aumenta específicamente la traducción de p53 mediante su asociación a secuencias reguladoras en el ARNm de p53 en situaciones de estrés biogénico (Takagi et al., 2005) y, además, que la reducción de los niveles de L26 desencadena la reducción específica de la traducción del ARNm de p53, en un mecanismo independiente de Mdm2 (Takagi et al., 2005).

Pretendíamos explorar cuál era el mecanismo molecular subyacente al efecto de evasión de la parada inducida por p53 que mostraban nuestros fragmentos antisentido contra las RPs. Para ello, primero analizamos si la expresión ectópica de los fragmentos antisentido reducía el nivel de la proteína p53 *in vivo*. La transfección de células HEK293T con un plásmido de eGFP-p53 bajo un promotor constitutivo LTR, genera células que expresan GFP dentro del núcleo (Figura 9B). La cotransfección de eGFP-p53 con *mdm2* no producía células con núcleos homogéneamente fluorescentes, ya que Mdm2 media la degradación de eGFP-p53. Así, sólo se observaban pequeños puntos fluorescentes dentro del núcleo, que parecían coincidir con los nucleolos, y que podrían corresponderse con la pequeña porción de eGFP-p53 resistente a la degradación. El mismo patrón de fluorescencia se observaba cuando las células se cotransfectaban con eGFP-p53 y los distintos fragmentos antisentido contra las RPs (Figura 9B y datos no mostrados). En todos los casos, los niveles de GFP se redujeron. Encontramos casos en los que la supresión de la fluorescencia fue completa y otros en los que la reducción fue moderada (Figura 9B y datos no mostrados). En la mayoría de los casos se detectaba una fluorescencia que parecía asociada al nucleolo, probablemente

debido a la resistencia frente a la degradación una vez que p53 se localiza en estos cuerpos. El análisis del nivel de la proteína eGFP-p53, confirmó la reducción de p53 en presencia de los fragmentos antisentido contra las RPs (Figura 9C y datos no mostrados).

Finalmente, para discriminar entre los dos mecanismos anteriormente propuestos por los que las RPs pueden modular el nivel de la proteína p53, decidimos expresar el ARNm completo de p53 (incluyendo las secuencias 5' y 3' no codificantes) en MEFs nulos para *p53* y *mdm2*, en presencia de varios de nuestros fragmentos antisentido contra RPs. En este escenario, pudimos valorar los niveles de p53 en ausencia de regulación negativa por Mdm2 (Figura 9D). Nuestros experimentos mostraron que cuando p53 se transfectaba en células que ya expresaban de forma estable los fragmentos antisentido contra RPs, la cantidad de p53 expresada por las células disminuía considerablemente (Figura 9D). Finalmente, usando el mismo modelo celular, chequeamos si nuestros fragmentos antisentido contra RPs eran capaces de modular la actividad transcripcional de p53 exógeno, independientemente de Mdm2. Para ello, los MEFs nulos para *p53* y *mdm2*, y que expresaban de forma estable los fragmentos antisentido contra RPs, fueron cotransfectados de forma transitoria con el ARNm completo de p53 y el gen de la luciferasa bajo el promotor de bax. Encontramos que todos los fragmentos antisentido analizados reducían de forma significativa la transactivación dependiente de p53 del promotor de bax (Figura 9E). Debemos resaltar la distinta respuesta del promotor al fragmento antisentido contra S9, según se trate de células con o sin *mdm2* (Figuras 9A y E).

Estos resultados indican que el silenciamiento parcial de un grupo de RPs bloquea específicamente la traducción de p53, tal como ha sido propuesto previamente para otra proteína ribosomal: L26 (Takagi et al., 2005). Sin embargo, las diferencias en la respuesta a diferentes fragmentos antisentido entre células con o sin *mdm2*, sugieren que otro mecanismo relacionado con Mdm2 podría coexistir.

6.3.3. Las proteínas ribosomales como supresores tumorales.

Finalmente, si las reducciones en los niveles de proteínas ribosomales pueden reducir la cantidad de p53 activo, entonces las RPs podrían comportarse como supresores tumorales si el contexto celular es el apropiado. Para analizar esta

posibilidad, hibridamos matrices de cDNA de muestras emparejadas tumorales/no tumorales del mismo paciente, para medir los niveles de ARNm de varias RPs. Encontramos que la eliminación completa del ARNm de cualquiera de las RPs analizadas era muy infrecuente (datos no mostrados). En la mayoría de los casos encontramos un 10-15% de muestras con reducciones de hasta el 50% en el nivel del ARNm de las RPs (Figura 10).

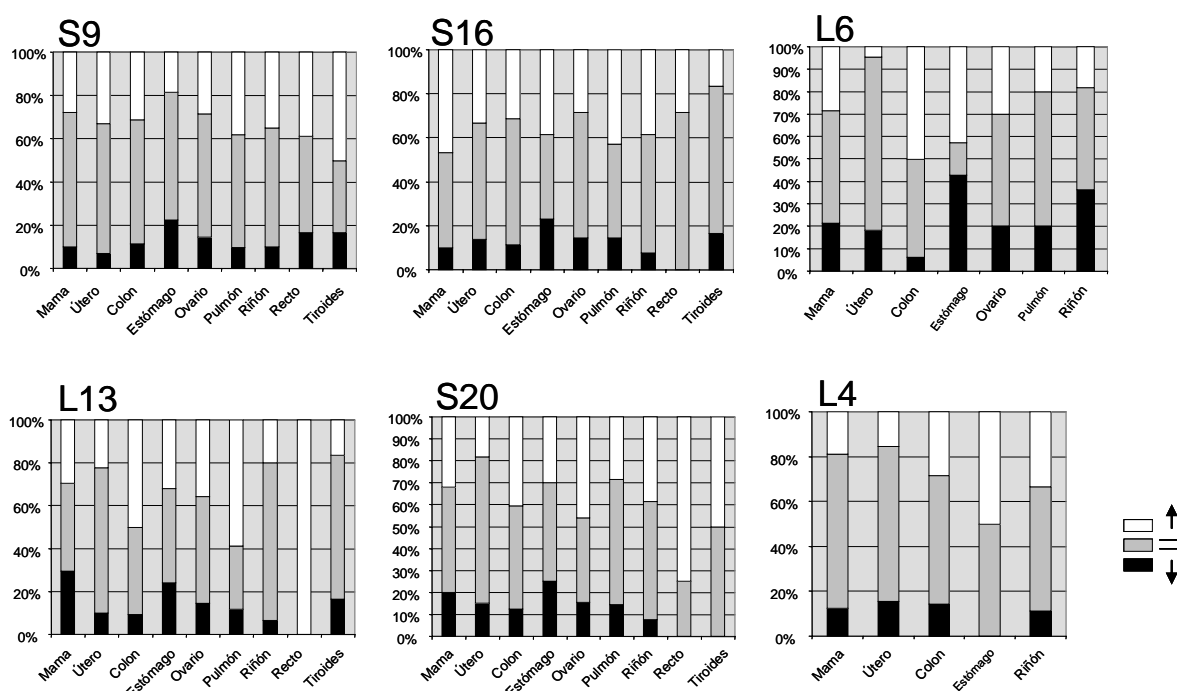


Figura 10: Porcentaje de alteraciones observadas en los ARNm de RPs en los tumores con respecto a las muestras no tumorales del mismo tejido y paciente. Usamos matrices de cDNA (de BD Biosciences) en las que muestras pareadas no tumorales/tumorales del mismo paciente se hibridaron con sondas marcadas con P^{32} de los genes S9, S16, L6, L13, S20 y L4, para determinar la respectiva cantidad de ARNm de S9, S16, L6, L13, S20 y L4. La misma membrana se hibridó con ubiquitina como un control endógeno para normalizar la cantidad de cDNA cargada en cada muestra. La figura muestra la cantidad relativa de muestras tumorales en las que existe sobreexpresión (columnas en blanco), reducción de la expresión (en negro) o sin variación (en gris) de los ARNm de S9, S16, L6, L13, S20 y L4, con respecto al tejido normal correspondiente. Todas las muestras se normalizaron contra su señal de hibridación de la ubiquitina. Usamos >25 muestras de tumores de mama, excepto para L6 y L4, en las que se usaron 14 y 16 muestras respectivamente. Usamos >20 muestras de tumores de útero, excepto para L4, en la que se usaron 13 muestras. Se usaron >30 muestras de carcinomas de colon, excepto para L6 y L4, en las que usamos 16 y 7 muestras respectivamente. Se usaron >20 muestras de tumores de estómago, excepto para L6 y L4, en las que usamos 7 y 2 muestras respectivamente. Se usaron entre 10 y 14 muestras de tumores de ovario para las diferentes RPs. En el caso de los tumores de pulmón, usamos >20 muestras, excepto para L6, en la que sólo se usaron 5 muestras. En tumores de riñón, usamos >15 muestras, excepto para L6 y L4, en las que se usaron 11 y 9 muestras respectivamente. En tumores de recto, usamos 18, 7, 3 y 4 muestras para S9, S16, L13 y S20, respectivamente. Se usaron 6 muestras para tumores de tiroides.

Para confirmar estos datos, analizamos la expresión de las diferentes RPs por PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT/PCR) comparando los niveles de ARNm en tejido tumoral y normal provenientes del mismo órgano y paciente. Así se analizaron muestras de 20 pacientes con tumores de pulmón, colon o próstata. Los resultados mostraron que alrededor del 20% de los tumores de pulmón, próstata o colon tenían

niveles reducidos de S16 (Figura 11), mientras que el porcentaje de tumores con niveles reducidos de S20 era ligeramente menor (Figura 11). Finalmente, sólo un par de tumores (que representan menos del 5%) mostraban niveles reducidos de L6 (Figura 11). Es interesante el hecho de que, en la inmensa mayoría de los casos, la reducción de los ARNm de las RPs sólo llegaba a un 50%.

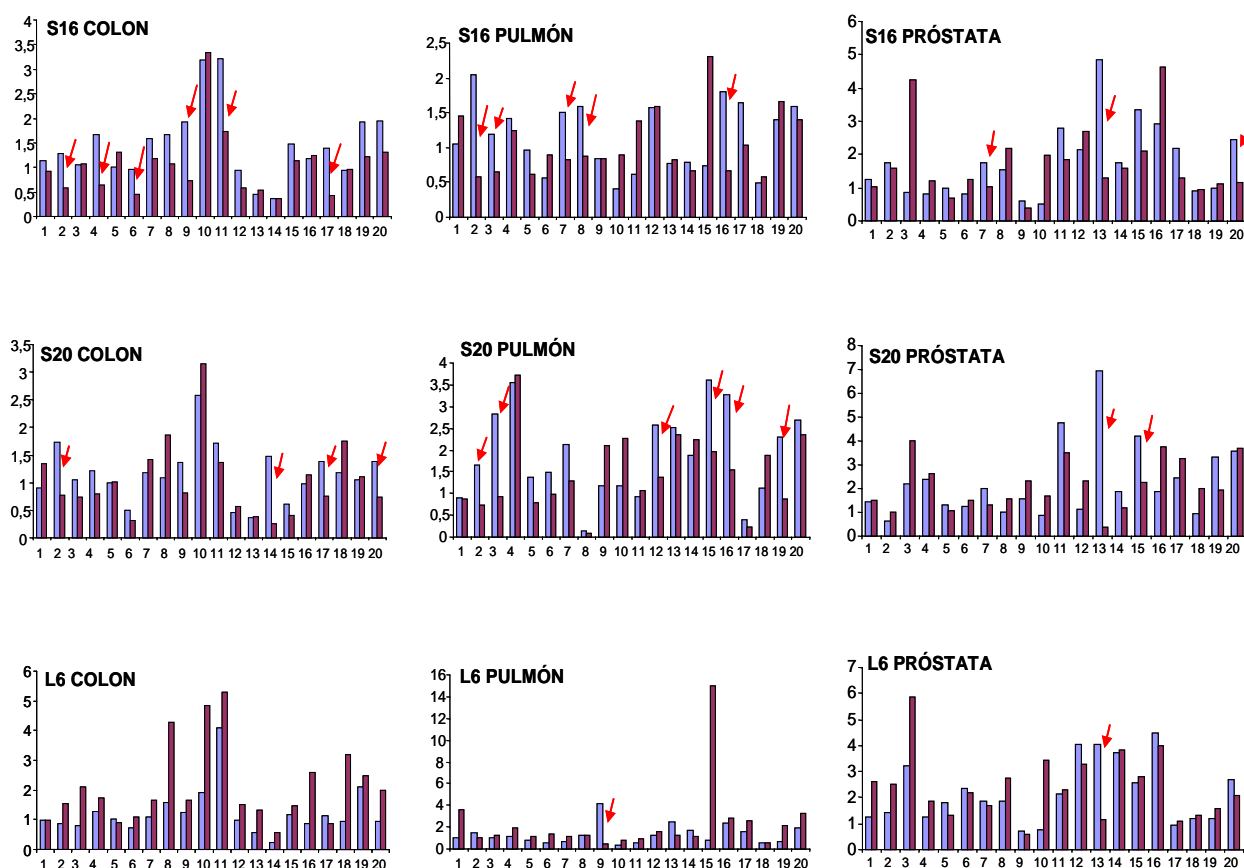


Figura 11: Determinación cuantitativa del ARNm de RPs en muestras tumorales. Determinamos los niveles de ARNm de S16, S20 y L6, en tumores de colon, pulmón y próstata, por PCR cuantitativa. Se extrajo ARNm de tejido tumoral y normal de 20 pacientes de cada tipo tumoral. Los niveles de ARNm de S16, S20 y L6 se cuantificaron en cada muestra por Q/RT-PCR como queda detallado en el apartado "Materiales y Métodos". Las flechas indican muestras con niveles reducidos de ARNm.

6.4. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE p53 Y LOS SIGUIENTES GENES: *SLK*, *CINP*, *ATX*, *BRCA1* Y *MYBBP1A*.

Entre los fragmentos antisentido descubiertos en el rastreo genético primario se encontraban fragmentos contra los siguientes genes:

- *SLK* (también denominado 'STE20-like kinase' o STK2)
- *CINP* (de 'cyclin-dependent kinase 2-interacting protein')
- *ATX* (también denominado SMG1 o LIP)

- *BRCCA1* (también designado como ARID4B o 'retinoblastoma binding protein 1-like 1')
- *MYBBP1A* (P160, PAP2).

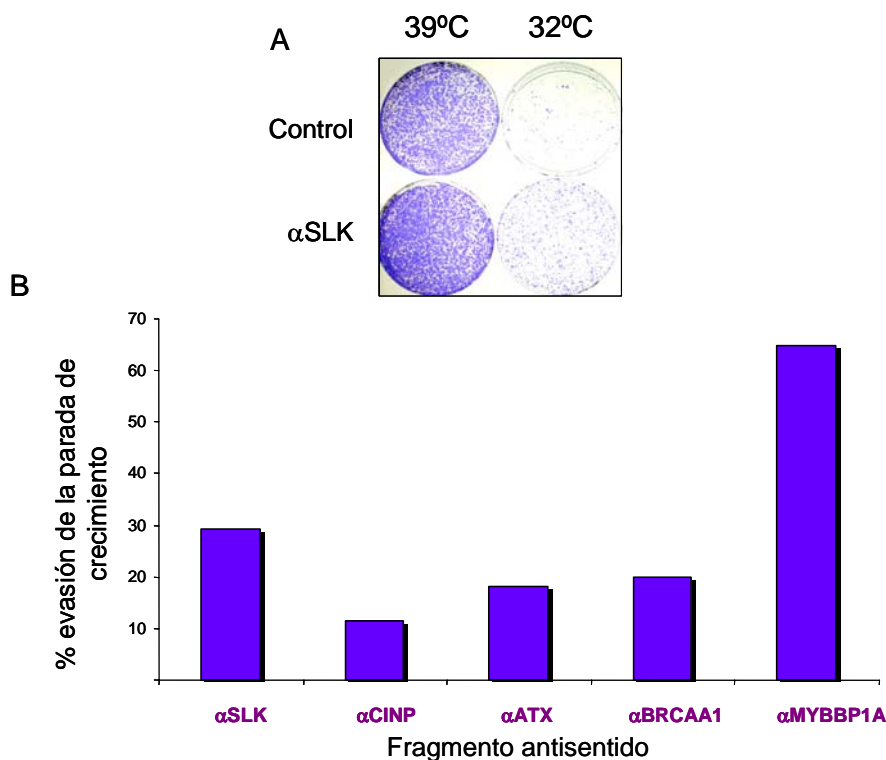


Figura 12: Porcentaje de evasión de la parada de crecimiento inducida por p53, producido por cada uno de los cinco fragmentos antisentido seleccionados. A) Ejemplo de inhibición de la parada inducida por p53. Se muestra el efecto del fragmento αSLK. 6×10^4 células p53^{-/-;ts} se incubaron a la temperatura restrictiva (39°) o permisiva (32°) durante una o dos semanas respectivamente. A continuación las células fueron fijadas con glutaraldehído al 0.5% y teñidas con cristal violeta al 1% para visualizar el crecimiento de colonias. **B)** El porcentaje de evasión de la parada inducida por p53 producido por cada uno de los fragmentos antisentido, se calculó como el porcentaje de colonias que crecían a 32°C con respecto al 100 % de colonias que crecieron a 39°C en el mismo experimento, y restando el porcentaje residual mínimo observado a veces en el control negativo.

Los fragmentos antisentido contra estos genes superaron la verificación secundaria al inducir crecimiento en la línea celular **p53^{-/-;ts}** a la temperatura permisiva, evadiendo parcialmente el efecto de parada de ciclo celular inducido por *p53* y que se observaba en la placa control sin ningún fragmento antisentido (Figura 12A). El porcentaje de evasión de los distintos fragmentos (calculado como el porcentaje de colonias que crecen a 32°C respecto al 100% de colonias que crecen a 39°C en el mismo experimento) oscilaba entre un 11 y un 65% sobre el crecimiento del control negativo (Figura 12B).

6.4.1. Efecto sobre la actividad transcripcional de p53.

Pretendíamos dilucidar el mecanismo por el cual estos genes modulaban la actividad de p53. Para valorar si los fragmentos antisentido contra los genes anteriores alteraban la actividad transcripcional de p53, medimos la expresión de un gen reportero bajo un promotor que responde a p53, coexpresándolo ectópicamente con los distintos fragmentos antisentido y con p53. Con esa finalidad, cotransfectamos células H1299 con tres plásmidos distintos que contenían lo siguiente: el cDNA de p53 bajo un promotor LTR, el gen de la luciferasa bajo el promotor de bax (promotor que responde a p53) y los fragmentos antisentido bajo un promotor CMV. Encontramos que tres de los fragmentos antisentido (α -SKL, α -BRCAA1, α -ATX) reducían entre un 20-30% la transactivación dependiente de p53 del promotor de bax, mientras que los otros dos (α -CINP, α -MYBBP1A) no lo hacían (Figura 13). El vector vacío pMaRX-IV no alteró la actividad de p53 y por el contrario, la expresión de *mdm2* (como control positivo) redujo la transcripción a niveles basales.

El mismo patrón se observó cuando se utilizó el promotor de p21. α -SKL, α -BRCAA1 y α -ATX reducían hasta cierto grado la transactivación dependiente de p53 del promotor de p21 (datos no mostrados).

Estos datos confirman que los fragmentos antisentido de *slk*, *atx* y *brcaa1* eran capaces de reducir la actividad de p53.

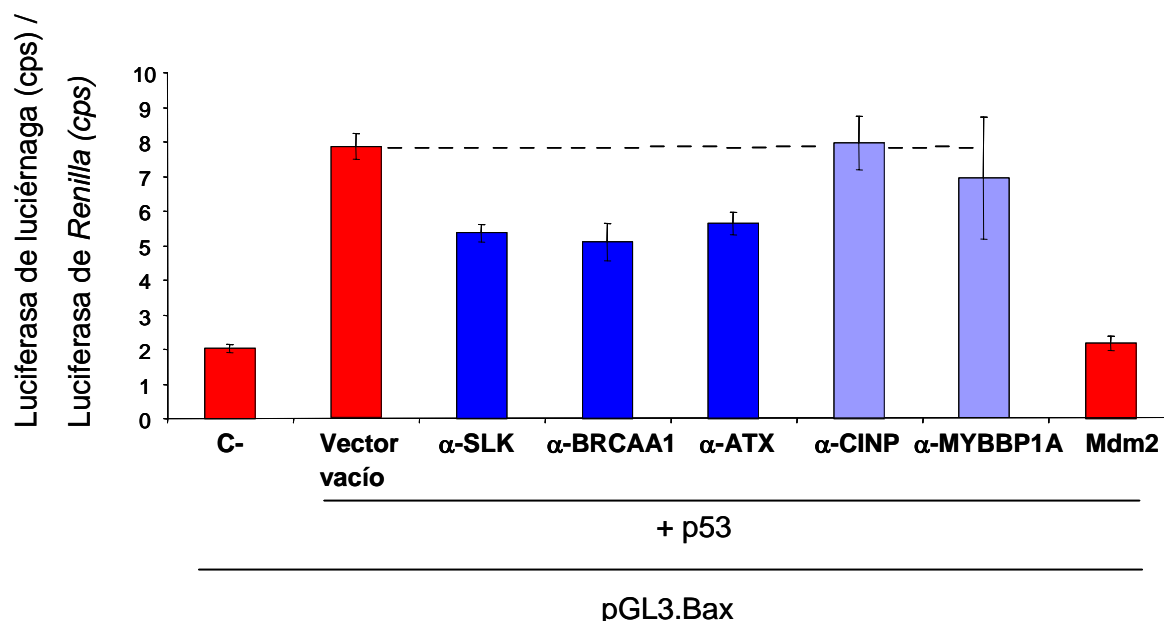


Figura 13: Efecto de los fragmentos antisentido sobre la activación transcripcional inducida por el cDNA de p53. Las células nulas para p53, H1299, se cotransfectaron con un plásmido reportero con el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el promotor de bax y un plásmido con p53 bajo un promotor LTR. La primera barra (c-) se corresponde con células control que se transfectaron con el plásmido reportero (pGL3.Bax) y un plásmido vacío sin p53. Las barras siguientes (de la segunda a la octava) se corresponden con células que se transfectaron además con un plásmido para la expresión constitutiva del fragmento antisentido indicado (o vector vacío y Mdm2 en el caso de los controles) bajo un promotor CMV. La actividad luciferasa dual se midió tal como se indica en el apartado "Materiales y Métodos".

6.4.2. Respuesta tras daño en el DNA inducido por doxorrubicina.

Para estudiar el efecto de los fragmentos antisentido en la respuesta de p53 tras daño en el DNA, células NIH3T3 transducidas con los fragmentos antisentido o con vector pMaRX-IV vacío, se trataron con doxorrubicina. En estas células, p53 se activa con este agente inductor de daño en el DNA.

Tras el tratamiento, se analizaron los niveles de p53, p21 y Bax. Los niveles de p53 aumentaron con el tratamiento de doxorrubicina tanto en las células transducidas con el vector vacío como en las transducidas con cualquiera de estos fragmentos antisentido (Figura 14). Por lo tanto, ninguno de ellos estaba afectando a la estabilidad de p53. De la misma forma, los niveles de p21 aumentaron, tal como era esperable, en las células transducidas con el vector vacío, tras 8 horas del tratamiento con doxorrubicina (0.4 $\mu\text{g/mL}$ ó 0.8 $\mu\text{g/mL}$). Este efecto tampoco se vio

alterado en las células transducidas establemente con cualquiera de los fragmentos antisentido analizados (Figura 14). Por lo tanto, ninguno de ellos está afectando a la activación transcripcional de p21, por p53, tras daño en el DNA inducido por doxorubicina.

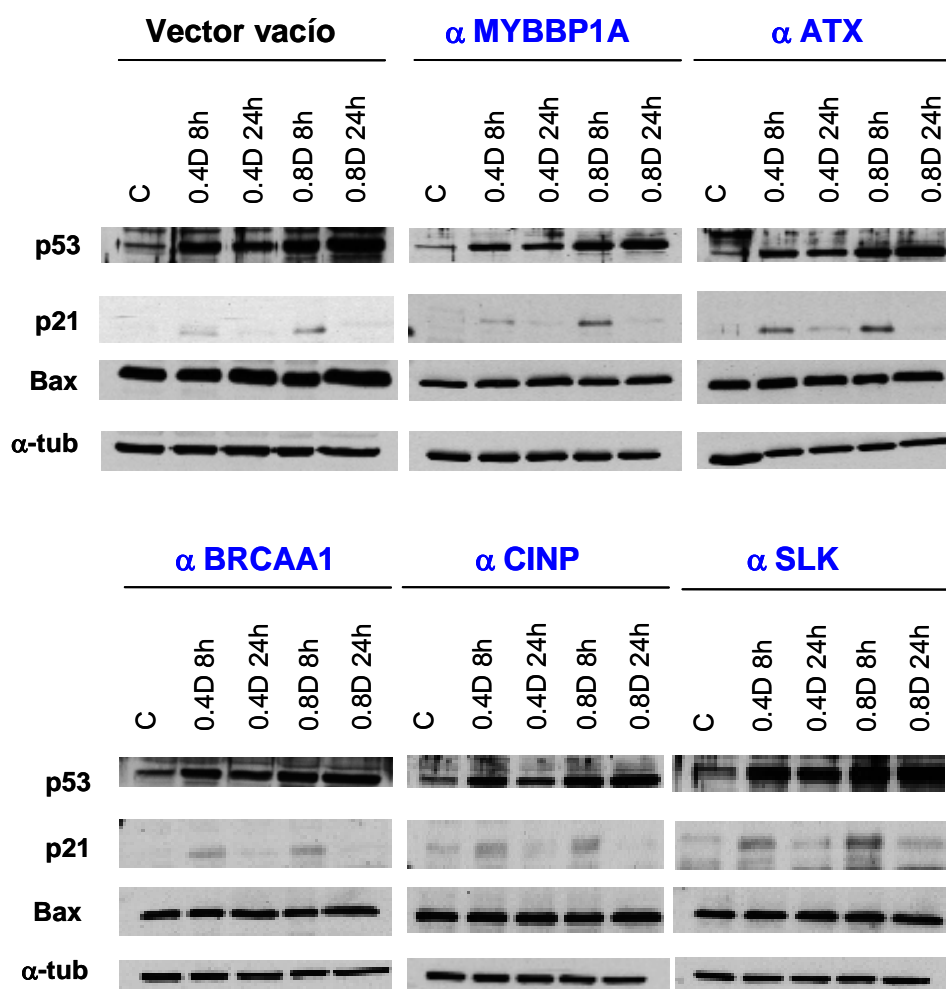


Figura 14: Análisis de la respuesta transcripcional de p53 tras daño en el DNA inducido por Doxorubicina, con los distintos fragmentos antisentido. Las células NIH3T3 transducidas con los fragmentos antisentido o con vector pMaRX-IV vacío, se trataron con doxorubicina (0.4 $\mu\text{g/mL}$ ó 0.8 $\mu\text{g/mL}$, durante 8 y 24 h). Se analizaron los niveles de p53, p21, Bax y α -tubulina por Western blot.

Estos datos no concuerdan con lo observado en el experimento con el promotor de p21, al menos en el caso de SLK, ATX y BRCAA1. Esto puede deberse a que existan elementos reguladores en el promotor genómico de p21 no incluidos en el vector utilizado en el experimento de la luciferasa o a que la respuesta transcripcional de p53 tras daño en el DNA inducido por doxorubicina en NIH3T3

sea distinta a la respuesta transcripcional de p53 exógeno en el experimento de la luciferasa en H1299. Una respuesta similar ha sido observada recientemente con el gen *PRAK*. La ausencia de *PRAK* bloquea la inducción de p21 en senescencia, pero no la inducción de p21 por luz UV (Sun et al., 2007).

6.4.3. Expresión dependiente de p53.

Siguiendo con la caracterización de la relación entre estos genes y p53, y ya que p53 es un factor de transcripción, nos preguntábamos si la expresión de alguno de ellos era directamente dependiente de p53.

Para ello, analizamos mediante Northern-blot la expresión del ARNm de estos 5 genes, tras la activación de p53 que se producía en la línea celular **p53-/-;ts** a la temperatura permisiva (32°C). Sólo *mybbp1a*, *atx* y *brcaa1* parecen estar transcripcionalmente modulados de manera muy tenue por p53 (Figura 15).

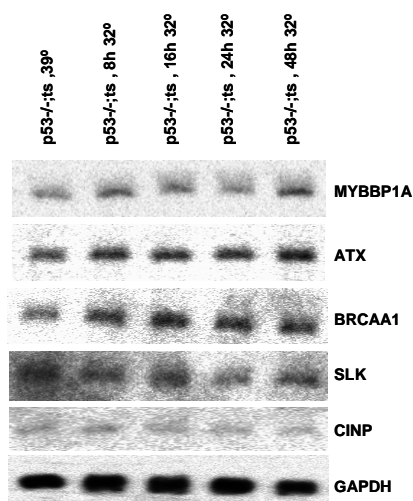


Figura 15: Análisis de la expresión de los 5 genes tras la activación de p53 ts a la temperatura permisiva. Para estudiar si la expresión de estos genes era directamente dependiente de p53, se extrajo ARNm total de la línea celular p53-/-;ts, tanto a la T^a restrictiva para p53 (39°C) como a diferentes tiempos (8, 16, 24 y 48h) a la T^a permisiva para p53 (32°C). Llevamos a cabo la técnica del Northern-blot, usando sondas específicas para cada uno de los genes (ver apartado "Materiales y métodos"). Se hibridó la misma membrana con una sonda específica para GAPDH, para asegurar la homogeneidad en la cantidad de ARNm cargado en cada caso.

6.4.4. Estos genes como supresores tumorales.

Finalmente, si las reducciones en los niveles de Slk, Cinp, Atx, Brcaa1 y Mybbp1a podían reducir la actividad del supresor tumoral p53, quizá entonces ellos mismos podrían comportarse como supresores tumorales si el contexto celular fuera el apropiado.

Nos preguntábamos si la expresión de alguno de estos genes estaba perdida en líneas celulares tumorales, bien comerciales o establecidas en nuestro laboratorio. Para ello, analizamos la expresión de los mismos por RT-PCR específica

(Figura 16). A pesar de lo que podía esperarse por resultados anteriores (Figura 12), la expresión de *mybbp1a* no estaba perdida en ninguna de las líneas celulares analizadas. La expresión de *slk*, *atx* o *cinp* estaba perdida en torno a un 20% de las distintas líneas. Sólo *cinp* parece estar predominantemente perdido en sarcomas. Por último, la expresión de *brcaa1* estaba perdida en un porcentaje muy pequeño (<10%), sólo en un liposarcoma y en un tumor maligno de la vaina de nervios periféricos (MPNST). (Figura 16). Por tanto, la pérdida de la expresión de algunos de estos genes en algunas líneas celulares, sobre todo de sarcomas, nos sugería la posible pérdida de estos genes también en tumores.

Sarcomas

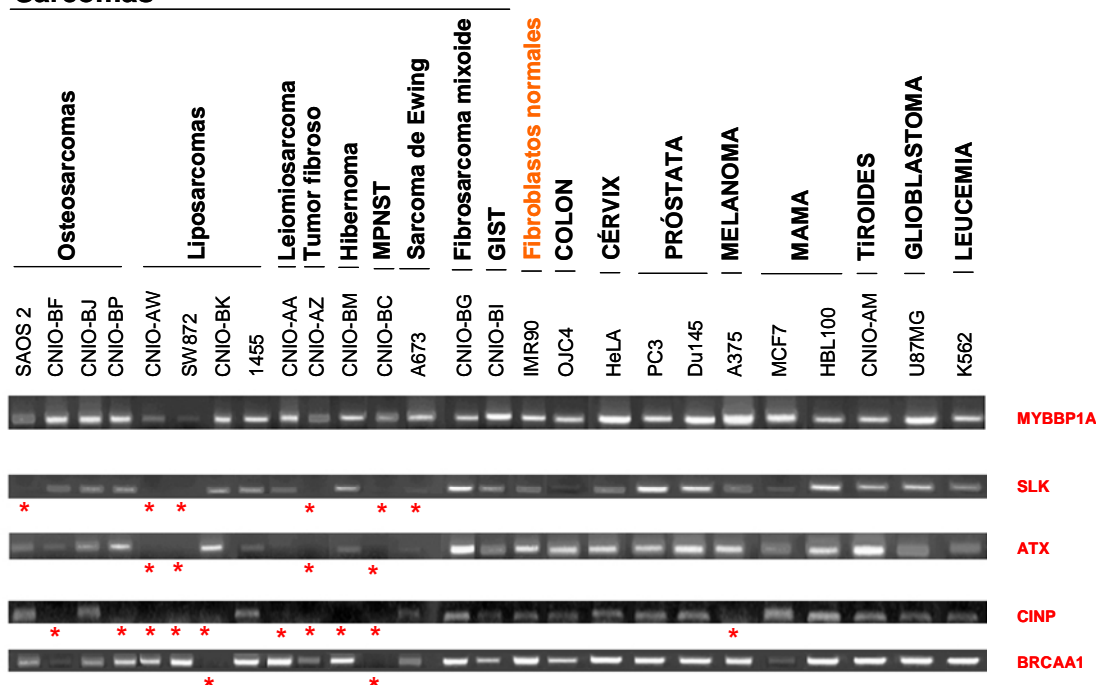


Figura 16: Análisis de la expresión de los 5 genes en líneas celulares tumorales comerciales o establecidas en el laboratorio. Mediante RT-PCR, y usando sondas específicas para cada uno de los genes, analizamos la expresión de los mismos en un panel de distintas líneas tumorales. Mediante asterisco señalamos la pérdida completa de la expresión del gen determinado. Observamos que en algunas líneas celulares de sarcomas, la expresión de algunos de estos genes estaba perdida. Usamos IMR90 como control, al tratarse de fibroblastos normales, no tumorales. MPNST: tumor maligno de la vaina de nervios periféricos.

Para seguir ahondando en la posibilidad de que estos genes se comportasen como supresores tumorales, hibridamos matrices de cDNA de muestras emparejadas tumorales/no tumorales del mismo paciente, para medir los niveles de ARNm de los distintos genes (Figura 17A). Encontramos que la eliminación total de los ARNm de estos genes era infrecuente, pero que en algunos tumores, la

expresión de algunos de estos genes estaba claramente reducida a un 50% (Figura 17A y 17B). Así, encontramos que la expresión de *mybbp1a* estaba reducida en el 10% de las muestras tumorales de mama, ovario, cuello del útero y testículo; en el 20% de las muestras tumorales de colon, útero, recto y próstata; y en más de un 30% de las muestras tumorales de tráquea, vejiga, tiroides, estómago, riñón y piel, llegando al 60% en páncreas, vulva e hígado. (Figura 17B). En cuanto a *slk*, observamos una reducción en su expresión en el 10% de las muestras tumorales de estómago, útero y testículo; en el 20% de las muestras tumorales de mama, colon, vejiga y cuello del útero; en el 25% de las de próstata; y en más del 30% de las de recto, tiroides, páncreas, tráquea, riñón y vulva, llegando al 55% en las muestras tumorales de piel. (Figura 17B). La expresión de *cinp* estaba reducida en el 10% de las muestras tumorales de ovario, colon, útero, cuello del útero, testículo, piel y páncreas; en el 20% de las de estómago, en el 30% de las de mama, recto, tráquea e hígado; en el 40% de las de vejiga y vulva; y en más del 50% de las muestras de tiroides y riñón. (Figura 17B). La expresión de *atx* se encontraba reducida en un bajo porcentaje, el 10%, en tumores de colon, útero, cuello del útero, recto y testículo; en el 20% de las de mama, ovario, vejiga y próstata; en torno al 30% en intestino delgado, tráquea e hígado; en el 40% de tumores de estómago; en el 50% de riñón y tiroides; en el 60% de vulva y piel y en el 71% de las muestras tumorales de páncreas. (Figura 17B). La expresión del gen *brcaa1* estaba reducida en menos tejidos tumorales distintos. Así, encontramos reducción de la expresión de *brcaa1* en el 10% de las muestras tumorales de mama, colon, útero, cuello del útero y testículo; en el 20% de las de piel; en el 25% de las de próstata; en el 30% de las de recto; en el 40% de las de tiroides y en el 50% de las muestras tumorales de riñón (Figura 17B).

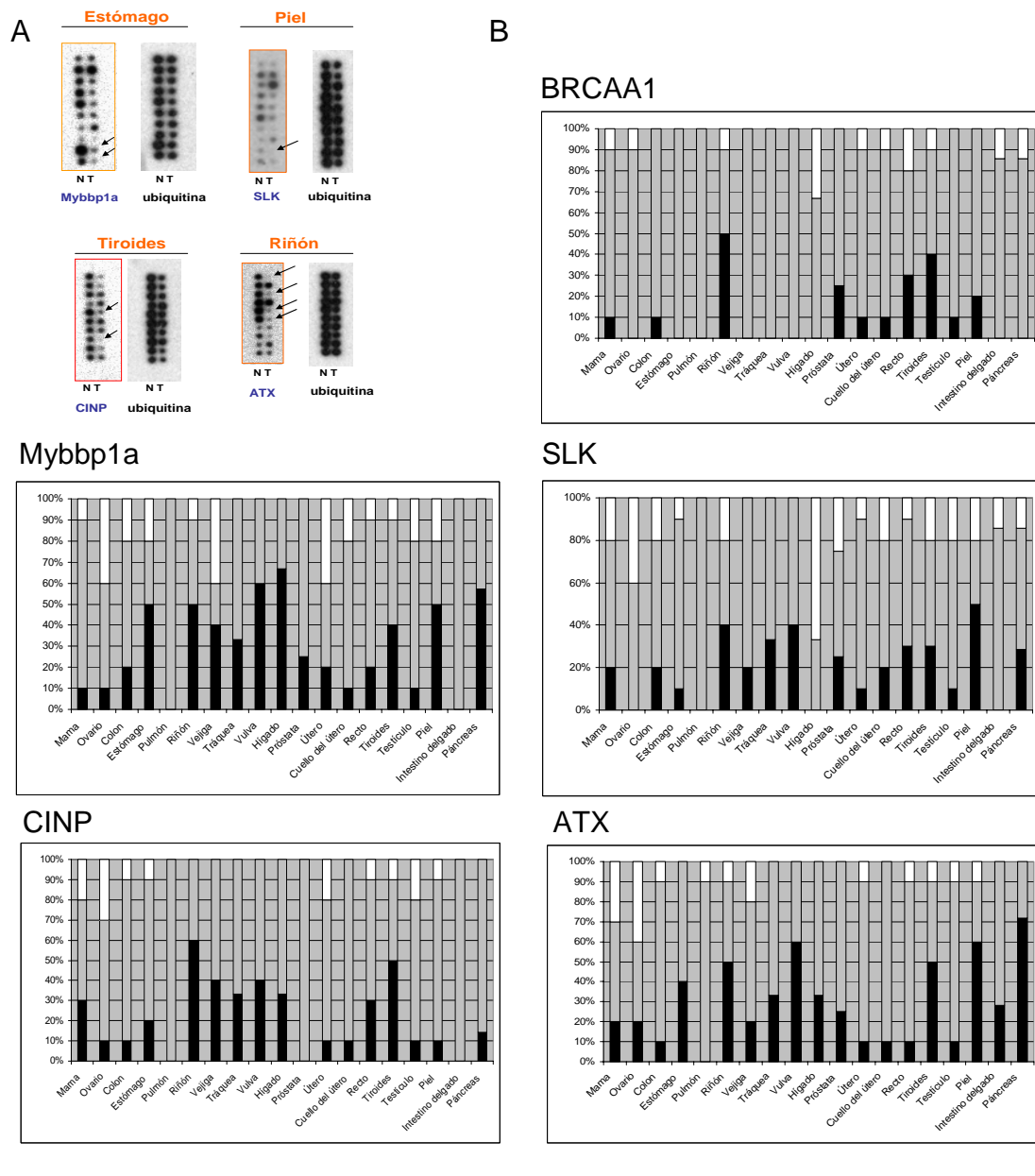


Figura 17: Análisis de la expresión de los 5 genes en tumores humanos. A) Hibridación de matrices de cDNA de muestras emparejadas tumorales/no tumorales del mismo paciente. Mediante el uso de sondas específicas para los distintos genes, pudimos analizar la cantidad de ARNm en muestras emparejadas de tejido normal (N) y tumoral (T). Se muestran ejemplos de la expresión de distintos genes en distintos tejidos. La misma membrana se hibridó con ubiquitina como un control endógeno para normalizar la cantidad de cDNA cargada en cada muestra. Mediante flechas señalamos casos en los que hay una reducción clara en la cantidad de ARNm en la muestra tumoral con respecto a la normal del mismo tejido y paciente. **B) Representación gráfica de los resultados obtenidos tras la hibridación de las matrices de cDNA.** La figura muestra el porcentaje de muestras tumorales en las que existe sobreexpresión (columnas en blanco), reducción de la expresión (en negro) o sin variación (en gris) de los ARNm de BRCA1, Mybbp1a, SKL, CINP y ATX, con respecto al tejido normal correspondiente. Todas las muestras se normalizaron contra su señal de hibridación de la ubiquitina.

6.5. CARACTERIZACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE PPP1CA , p53 Y RAS.

En el rastreo genético primario recuperamos, de forma independiente, dos fragmentos de 133 nucleótidos contra *ppp1ca* (subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa, PP1 α).

El fragmento antisentido contra *ppp1ca* superó la verificación secundaria al inducir aproximadamente un 40% de crecimiento sobre el control negativo en la línea celular **p53^{-/-};ts** a la temperatura permisiva, evadiendo el efecto de parada de ciclo celular inducido por p53.

6.5.1. El ARN de interferencia creado contra *ppp1ca* evadía la parada del crecimiento inducida por ras y p53.

Como una confirmación adicional de que el efecto observado con el fragmento antisentido contra *ppp1ca* se debía a la inactivación de *ppp1ca*, analizamos el efecto de un shRNA contra *ppp1ca* de ratón. El shRNA diseñado específicamente contra *ppp1ca* de ratón reducía a la mitad el nivel de la proteína, cuando se introducía en la línea celular **p53^{-/-};ts;ras** (Figura 18A). Esta reducción parcial de la proteína Ppp1ca permitía un crecimiento celular significativo a la temperatura permisiva (Figura 18B), evadiendo el efecto de parada irreversible esperado cuando p53 recobraba su conformación activa, y en presencia del oncogén *ras*. Ningún efecto se observó cuando las células **p53^{-/-};ts;ras** se infectaban con vector pRetroSuper (pRS) vacío.

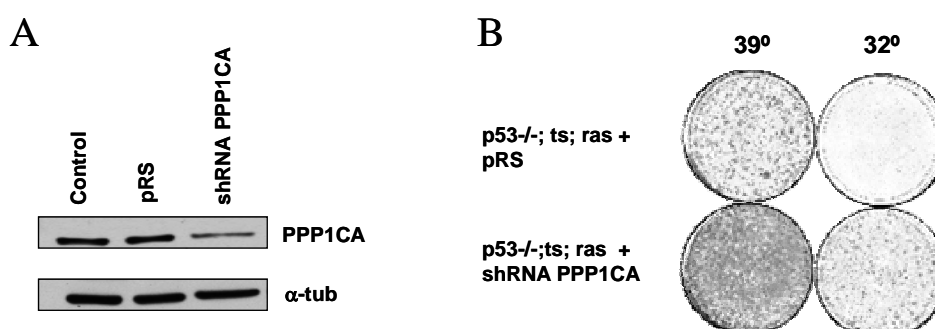


Figura 18: Efecto del shRNA contra *ppp1ca*. A) El shRNA contra *ppp1ca* redujo parcialmente el nivel de la proteína en las células p53^{-/-};ts;ras. Ese efecto no tuvo lugar cuando se usó vector pRS vacío. B) Las células p53^{-/-};ts;ras transducidas con el shRNA contra *ppp1ca* eran capaces de crecer parcialmente a la T^a permisiva para p53 (32°). Este efecto no se observaba cuando las células estaban transducidas con el vector vacío pRS.

6.5.2. La proteína de Ppp1ca aumentaba de forma dependiente de Ras y se estabilizaba por p53.

Anteriormente se ha propuesto que PP1 α es una fosfatasa que desfosforila a Bad, y cuya actividad enzimática está regulada por Ras (Ayllon et al., 2000). También se ha publicado que existe una correlación entre la activación de Ras y la activación de PP1 y PP2A (Rajesh et al., 1999). Sin embargo, aún no ha sido dilucidado cómo está ejerciendo *ras* esa función. Para intentar resolver esa cuestión, estudiamos los niveles del ARNm y proteína de Ppp1ca en nuestro sistema.

Analizamos el nivel de ARNm de PPP1CA por Northern-blot, utilizando una sonda específica contra una región de la isoforma alfa que no tiene homología con las isoformas beta y gamma, y los niveles máximos de expresión no se correlacionaban con la expresión del oncogén *ras*, ni en las células **p53^{-/-};ts;ras** ni en los fibroblastos silvestres que expresaban el oncogén *ras* (Figura 19A). Sin embargo, utilizando una sonda que hibrida con las tres isoformas, hemos observado que es la isoforma beta la dependiente de Ras a nivel transcripcional (datos no mostrados).

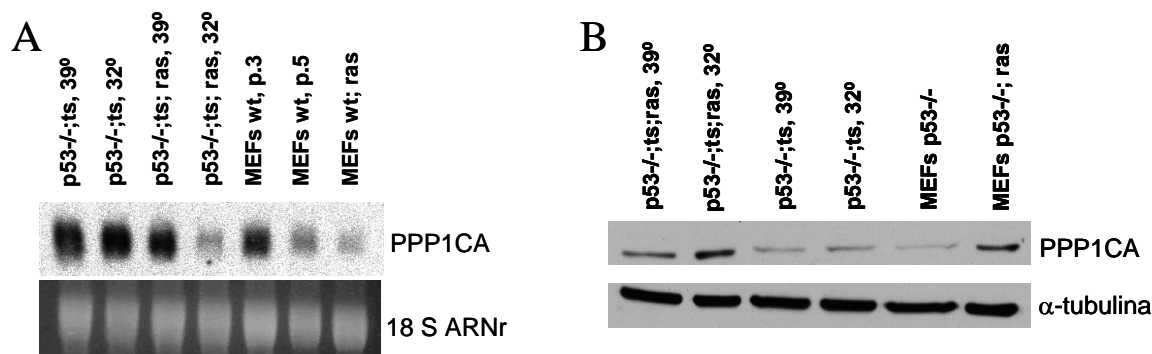


Figura 19: Análisis de los niveles de ARNm y proteína de Ppp1ca en nuestro sistema. A) Los niveles de ARNm de PPP1CA se analizaron por Northern blot en MEFs p53^{-/-}; ts y MEFs p53^{-/-}; ts;ras, a 39°C y 32°C, así como en MEFs silvestres en distinto pase celular y en MEFs silvestres con el oncogén *ras*. Se usó una sonda específica para el reconocimiento de la isoforma PPP1CA. Se muestra el ARNr 18S como control de carga. **B)** La cantidad de proteína de Ppp1ca se analizó por Western blot en MEFs p53^{-/-}; ts y MEFs p53^{-/-}; ts;ras, a 39°C y 32°C, así como en MEFs p53^{-/-} y MEFs p53^{-/-};ras. Se muestra la proteína α -tubulina como control de carga.

Por otro lado, el análisis de los niveles de la proteína, reveló un incremento de Ppp1ca dependiente de Ras tanto en las células **p53^{-/-};ts;ras** como en las **p53^{-/-};ras** (Figura 19B). También se observó un incremento en los niveles de la proteína de Ppp1ca comparando las células a 32° con las células a 39° (Figura 19B),

indicando que cierta estabilización de la proteína estaba siendo llevada a cabo por p53.

Por lo tanto, parece que existe una regulación postraducciona de la proteína Ppp1ca por el oncogén *ras* y por p53, que causa un aumento o estabilización de la proteína.

6.5.3. Respuesta tras daño en el DNA.

En las células NIH3T3, diversos agentes que causan daño en el DNA activan la respuesta de p53, en un intento de reparación de ese daño o para evitar que la célula dañada transmita errores a las células hijas.

Para estudiar el efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en la respuesta de p53 frente al daño en el DNA, células NIH3T3 transducidas con el fragmento antisentido o con el vector vacío como control, se trataron con doxorubicina. A continuación, se analizaron los niveles de las proteínas p53, p21 y Bax. Los niveles de p53 aumentaron tanto en las células con el vector vacío como en las células con el fragmento antisentido de *ppp1ca* (Figura 20A), lo que indicaba que el fragmento antisentido de *ppp1ca* no estaba afectando a la estabilidad de p53. Sin embargo, los niveles de p21 aumentaron, tal como se esperaba, en las células NIH3T3 transducidas con el vector vacío, tras 8 horas de tratamiento con doxorubicina (0.4 $\mu\text{g/mL}$ ó 0.8 $\mu\text{g/mL}$), pero este efecto sí se vio alterado en las células que estaban transducidas establemente con el fragmento antisentido de *ppp1ca* (Figura 20A).

También quisimos estudiar el efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en la respuesta de p53 frente al daño en el DNA inducido por H_2O_2 . Las células NIH3T3 se trataron con concentraciones de H_2O_2 que han sido descritas como causantes de daño en el DNA, y los niveles de p21 se analizaron posteriormente. En el caso de las células transducidas con el vector vacío, observamos un aumento de p21 tras el tratamiento con 100 μM de H_2O_2 , pero en el caso de las células transducidas con el fragmento antisentido de *ppp1ca*, los niveles de p21 no aumentaron con el tratamiento de H_2O_2 , comparado con el control sin tratar (Figura 20B). Sin embargo, hay que resaltar que también observábamos un nivel de p21 basal bastante elevado en presencia del fragmento antisentido de *ppp1ca*, en el control sin tratar con H_2O_2 .

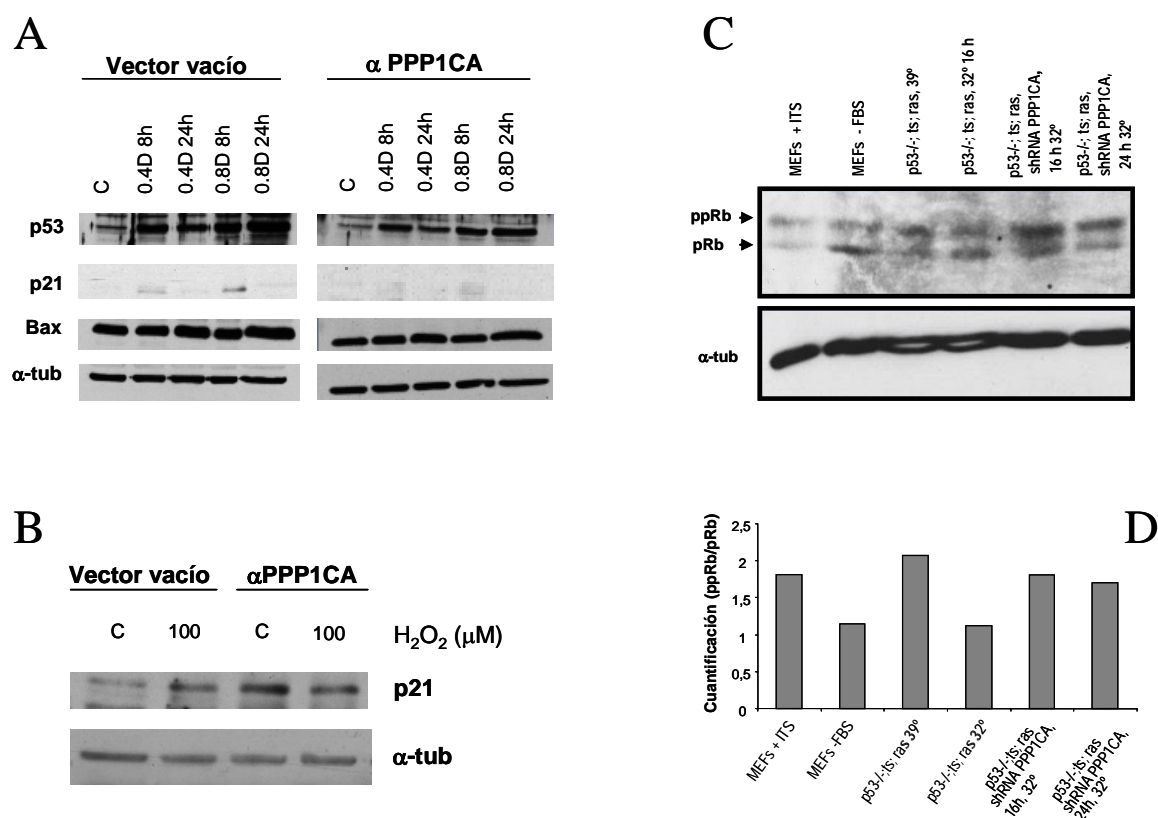


Figura 20: Caracterización del efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en la respuesta a daño en el DNA inducida por Doxorubicina y H₂O₂ y análisis del estado de fosforilación de pRb en nuestro sistema. A) Efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en el daño a DNA inducido por doxorubicina en células NIH3T3. Se muestran Western blots de las proteínas p53, p21, Bax y α-tubulina, en células transducidas con el antisentido de *ppp1ca* o con vector vacío como control. Usamos concentraciones de doxorubicina de 0.4 μg/mL ó 0.8 μg/mL, durante 8 y 24 h. **B)** Efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en el daño a DNA inducido por H₂O₂ en células NIH3T3. Se muestran Western blots de p21 y α-tubulina en células transducidas con el antisentido de *ppp1ca* o con vector vacío. Las células se trataron con 100 μM de H₂O₂, durante 6 h. **C)** Western blot que nos permite analizar simultáneamente las formas hiperfosforilada (ppRb) e hipofosforilada (pRb) de la proteína de retinoblastoma. α-tubulina se usó como control de carga. La imagen mostrada es representativa de tres experimentos llevados a cabo independientemente. **D)** Medida de la relación entre ppRb y pRb, cuantificando la intensidad de cada banda con un densitómetro.

6.5.4. El ARN de interferencia contra *ppp1ca* puede cambiar el estado de fosforilación de pRb.

La proteína fosfatasa 1 (PP1) ha sido identificada como la fosfatasa que desfosforila a pRb (Nelson et al., 1997) y esto se ha relacionado con la parada del crecimiento celular (Alberts et al., 1993; Berndt et al., 1997; Rubin et al., 1998). Si esto fuese cierto en nuestro sistema, esperaríamos que el ARN de interferencia contra *ppp1ca* causase una inhibición parcial de ese efecto. Para verificar este

punto, realizamos un Western-blot para observar tanto la forma hiperfosforilada (ppRb) como la hipofosforilada de pRb.

Cuando las células están creciendo activamente, la forma hiperfosforilada de pRb (ppRb) es la predominante. Al contrario, cuando las células están paradas, la forma hipofosforilada es la mayoritaria. Los controles mostraron el patrón esperado. Así, en el caso de MEFs inmortalizados suplementados con ITS o de MEFs **p53^{-/-};ts;ras** mantenidos a 39°C, la forma predominante fue la hiperfosforilada, tal como era esperable para células proliferantes. Y justo al contrario, los MEFs deprivados de suero mostraban un enriquecimiento en la forma hipofosforilada de pRb (Figura 20C).

En nuestro sistema, la forma hipofosforilada de pRb era la predominante en el caso de las células **p53^{-/-};ts;ras** a 32°C, de acuerdo con la parada de crecimiento ejercida por p53 a esta temperatura permisiva. Al contrario, las **p53^{-/-};ts;ras** transducidas establemente con el ARN de interferencia contra *ppp1ca*, mostraron un aumento en la forma hiperfosforilada de la proteína pRb, cuando se mantuvieron durante 16 ó 24 horas a 32°C (Figuras 20C y 20D).

Estos resultados indican que la inhibición parcial de *ppp1ca* evita la desfosforilación de pRb tras la inducción de p53.

6.5.5. El oncogén *ras* aumenta los niveles endógenos de ceramidas.

Las ceramidas modulan diferentes respuestas celulares frente al estrés, incluyendo apoptosis, parada de ciclo celular y senescencia celular. Un simple aumento en la concentración intracelular de esta molécula señalizadora es suficiente para inducir muchas de estas respuestas a estrés (Hannun y Luberto, 2000). Es por ello que nos preguntábamos si las ceramidas estarían interviniendo en la señalización hacia senescencia inducida por p53 y *ras*, en nuestro sistema.

Una forma de analizar los lípidos sintetizados por las células es suministrar a las mismas un precursor marcado radiactivamente (en nuestro caso, ¹⁴C-Serina) con el medio de cultivo, y llevar a cabo posteriormente un análisis de la fracción lipídica por cromatografía en capa fina (TLC), en la que la banda correspondiente a cada lípido aparece a una altura determinada.

La medida de los niveles intracelulares de ceramidas en nuestro sistema mostraba un claro aumento en los MEFs **p53^{-/-};ts;ras**, comparados con los MEFs

p53^{-/-};ts, y eso ocurría tanto a la temperatura restrictiva para p53 (39°C) como a la permisiva (32°C). (Figura 21A). La esfingomielina (uno de los precursores de la ceramida), se usó para normalizar los niveles de ceramidas en la cuantificación (Figura 21A y 21B).

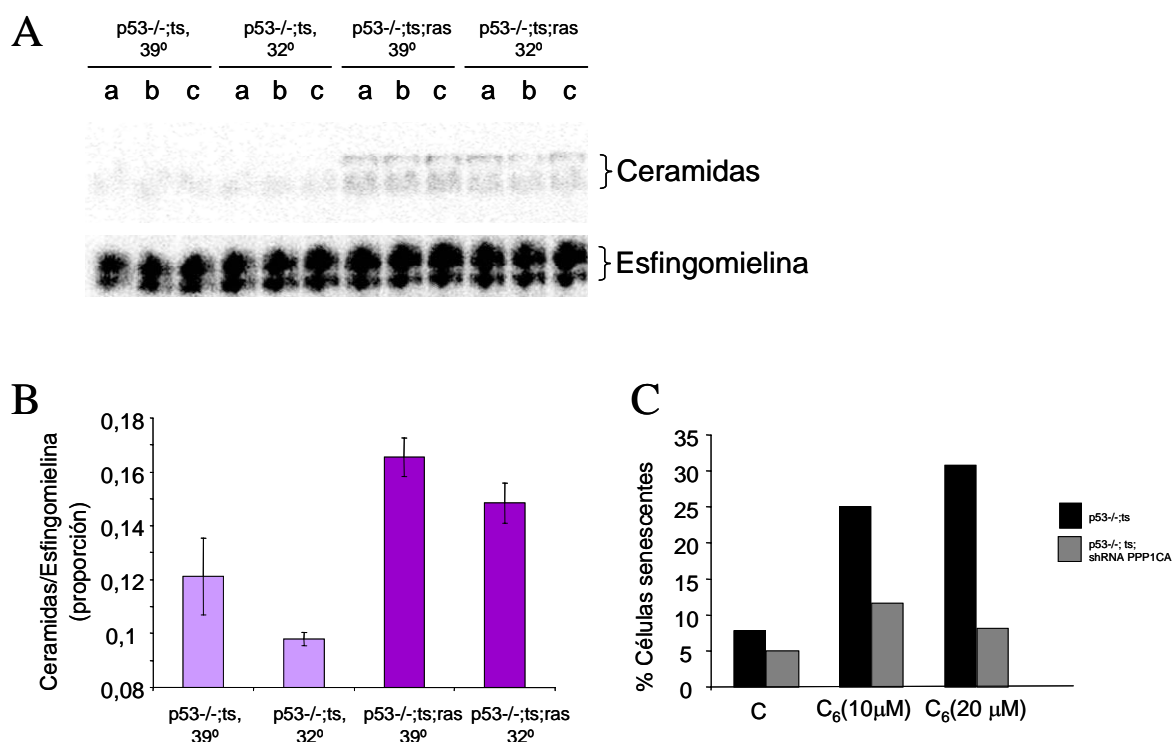


Figura 21: Medida de los niveles endógenos de ceramidas por TLC y efecto de la adición de ceramida C₆ exógena. A) La figura muestra las bandas de la TLC correspondientes a las ceramidas y la esfingomielina. a, b y c son triplicados de la misma condición. **B)** La radiactividad correspondiente a las bandas de ceramidas y esfingomielina fue cuantificada automáticamente con ayuda de un sistema radiográfico electrónico (Instantimager). Los valores de ceramidas se normalizaron con los de esfingomielina. Los resultados mostrados son los valores medios de los triplicados de un experimento, representativo de dos experimentos independientes con resultados similares. **C)** Las células p53^{-/-};ts o p53^{-/-};ts infectadas con el shRNA de PPP1CA, a 32°C, se trataron con 10μM ó 20μM de ceramida C₆ (N-hexanoil-esfingosina) (de Biomol). Tras 72 horas de la primera adición de ceramidas, las células se fijaron con glutaraldehído al 0.5% en PBS y se analizó la morfología senescente bajo el microscopio. La figura mostrada es representativa de diferentes experimentos independientes.

6.5.6. El ARN de interferencia de *ppp1ca* evadía parcialmente la senescencia inducida por ceramidas exógenas en los MEFs p53^{-/-};ts.

Aunque se conoce poco sobre la señalización hacia senescencia mediada por lípidos, se ha descrito que los niveles endógenos de ceramidas están marcadamente elevados, y además específicamente si se comparan con otros lípidos, en las células senescentes. Además, la adición de ceramida exógena, a una concentración que mimetizaba la encontrada en células senescentes, inducía un fenotipo senescente en fibroblastos humanos jóvenes (Venable et al., 1995). Nosotros nos

preguntábamos si la adición de ceramida exógena a MEFs **p53^{-/-};ts** induciría una parada del crecimiento celular con las características de la senescencia celular, de la misma forma que lo hace el oncogén *ras*.

De hecho, la adición de ceramida C₆ a la concentración de 10 ó 20μM, inducía senescencia en nuestro sistema. El porcentaje de células senescentes pasaba del 7.8% en las células **p53^{-/-};ts** sin tratar, al 25% o el 30.8% en el caso de las células tratadas con 10μM ó 20μM de ceramida C₆, respectivamente (Figura 22).

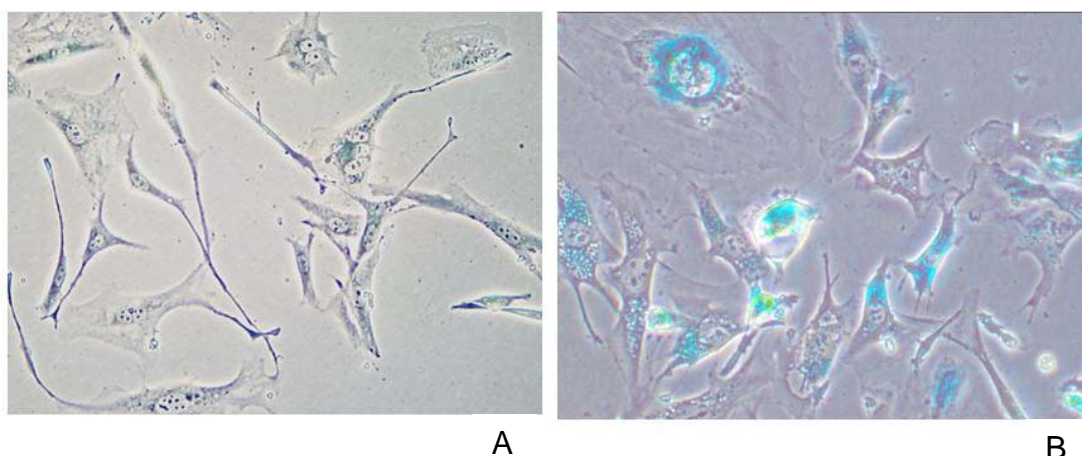


Figura 22: Inducción de senescencia con la adición de ceramida exógena. A) MEFs p53^{-/-}; ts sin tratar. **B)** MEFs p53^{-/-}; ts con 10μM de ceramida C₆.

Además, hay estudios que describen que la ceramida es capaz de activar, entre otras fosfatasa, a la proteína fosfatasa 1 (Hannun y Luberto, 2000; Lee et al., 2000), desembocando en parada del crecimiento. Por lo tanto, si *ppp1ca* es realmente un mediador en la señalización por ceramida en la parada del crecimiento de células estresadas en nuestro sistema, el ARN de interferencia de *ppp1ca* debería evitar este efecto. Es decir; nos proponíamos estudiar si *ppp1ca* estaba por debajo de la ceramida en la vía de señalización hacia parada celular irreversible.

Para comprobar esto, añadimos ceramida C₆ (10μM ó 20μM) a MEFs **p53^{-/-};ts** y a MEFs **p53^{-/-};ts** transducidos con el ARN de interferencia de *ppp1ca*, que habían sido trasladados a la temperatura permisiva para p53 (32°C) dos horas antes de comenzar el tratamiento con ceramida. Tras 72 horas de incubación, las células se fijaron y la morfología senescente se analizó bajo el microscopio. Observamos una reducción en el número de células senescentes en las células

transducidas con el ARN de interferencia para *ppp1ca*, comparadas con los MEFs **p53-/-;ts** control, tanto con el tratamiento de 10 μ M como con el de 20 μ M de ceramida C₆ (Figura 21C).

No obstante, debemos resaltar que también había una disminución generalizada en el número de células totales observadas en el caso de los MEFs **p53-/-;ts** transducidos con el ARN de interferencia de *ppp1ca*, lo que puede ser debido a la apoptosis también producida por la ceramida (datos no mostrados).

6.5.7. *Ppp1ca* como supresor tumoral.

Según el mismo planteamiento que hemos seguido para los distintos genes encontrados en este rastreo genético, si una reducción en los niveles de la proteína Ppp1ca, causada por fragmentos antisentido o ARN de interferencia, es capaz de evadir la parada del crecimiento inducida por *p53*, *ppp1ca* podría comportarse como un supresor tumoral. Para analizar esta posibilidad, hibridamos una matriz de cDNA de muestras emparejadas tumorales/no tumorales del mismo paciente, para medir los niveles de ARNm de PPP1CA (Figura 23A). Encontramos que la eliminación total del ARNm de este gen era infrecuente. No obstante, la expresión de *ppp1ca* estaba reducida en el 10% de las muestras tumorales de mama, estómago, tiroides y testículo; en el 15% de las de páncreas; en el 25% de las de próstata; en el 30% de las de riñón o piel; en el 33% de las de tráquea; en el 40% de las de vulva y en el 42% de las muestras tumorales procedentes de intestino delgado. (Figura 23A).

También se analizó la expresión de *ppp1ca* por PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT/PCR) comparando los niveles de ARNm en tejido tumoral y normal provenientes del mismo órgano y paciente. En 3 casos de tumores de pulmón se observó una reducción significativa en tejido tumoral frente al normal (Figura 23B).

La base de datos 'Oncomine', basándose en los datos de otros autores (Garber et al., 2001) nos proporciona información acerca de lo que ocurre en la metástasis a nódulo linfático de cáncer de pulmón con respecto al adenocarcinoma de pulmón. La expresión de *ppp1ca* está significativamente disminuida en el caso más agresivo, la metástasis (Figura 23C).

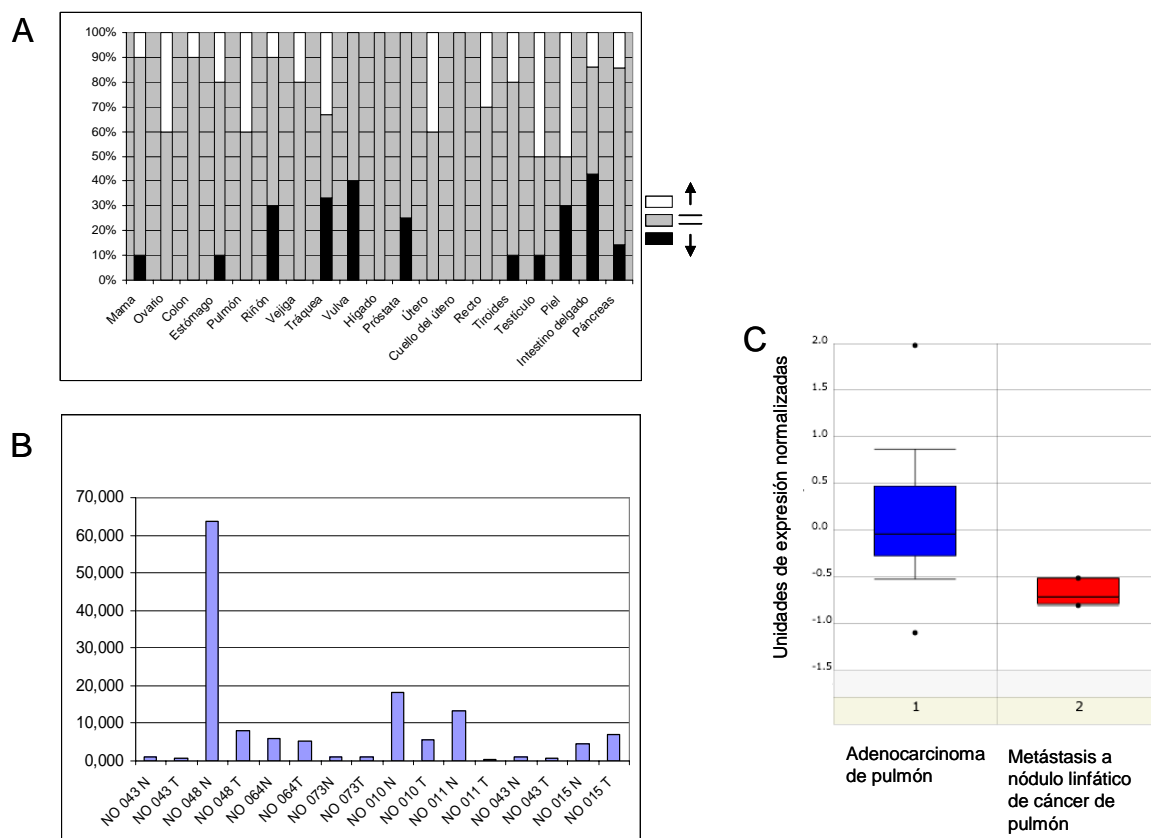


Figura 23: Análisis de la expresión de *ppp1ca* en tumores. A) Porcentaje de alteraciones observadas en el ARNm de PPP1CA en los tumores con respecto a las muestras no tumorales del mismo tejido y paciente. Usamos una matriz de cDNA (de BD Biosciences) en la que muestras pareadas no tumorales/tumorales del mismo paciente se hibridaron con una sonda marcada con P^{32} del gen *ppp1ca*, para determinar la cantidad de ARNm de PPP1CA. La misma membrana se hibridó con ubiquitina como un control endógeno para normalizar la cantidad de cDNA cargada en cada muestra. La figura muestra la cantidad relativa de muestras tumorales en las que existe sobreexpresión (columnas en blanco), reducción de la expresión (en negro) o sin variación (en gris) del ARNm de PPP1CA, con respecto al tejido normal correspondiente. Todas las muestras se normalizaron con la correspondiente señal de hibridación de la ubiquitina. B) Determinación cuantitativa del ARNm de PPP1CA en muestras tumorales de pulmón mediante Q/RT-PCR. Se extrajo ARNm de tejido tumoral y normal de 8 pacientes. Los niveles de ARNm de PPP1CA se cuantificaron en cada muestra por Q/RT-PCR como queda detallado en el apartado “Materiales y Métodos”. C) Niveles de expresión de *ppp1ca* en adenocarcinoma de pulmón y metástasis de pulmón. La base de datos ‘Oncomine’ nos proporciona la información de que en la metástasis a nódulo linfático de cáncer de pulmón, la expresión de *ppp1ca* está significativamente reducida con respecto al adenocarcinoma de pulmón.

6.5.8. La sobreexpresión de *ppp1ca* reduce parcialmente el crecimiento de colonias en HCT-116 p53^{-/-} y SAOS 2.

Basándonos en la predicción de secuencia genómica, observamos que podrían existir 7 variantes de procesamiento alternativo del gen *ppp1ca* de ratón. Tras la selección de cebadores específicos para las distintas variantes (Figura 24A), pudimos confirmar la existencia de al menos 5 de ellas en MEFs p53^{-/-};ts y MEFs p53^{-/-};ts;ras, por RT-PCR específica pseudocuantitativa (Figura 24B) y posterior secuenciación.

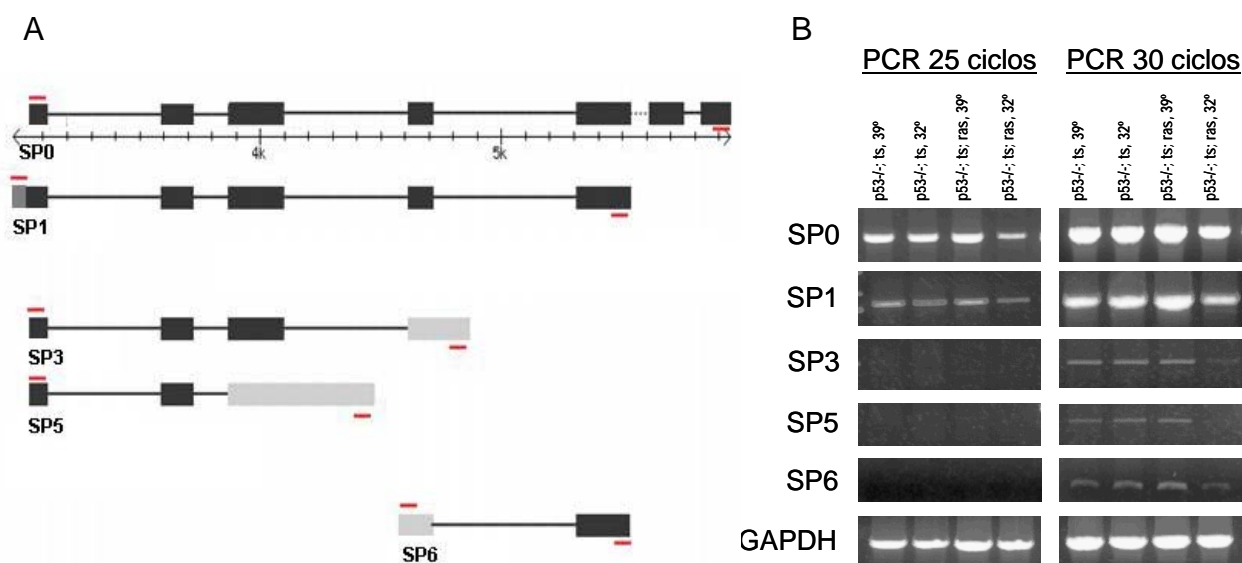


Figura 24: Diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca* de ratón. A) El diagrama muestra las diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca* cuya existencia hemos confirmado. Mediante pequeñas líneas rojas indicamos la localización de los cebadores específicos utilizados. B) RT-PCR pseudocuantitativa en MEFs p53^{-/-};ts y MEFs p53^{-/-};ts;ras. Casi todas las variantes aparecían en las diferentes condiciones, aunque con diferentes niveles de expresión. SP0 y SP1 eran las predominantes. Se realizó también una PCR específica para GAPDH, para verificar la homogeneidad en la cantidad del ARNm utilizado en cada caso.

A continuación las subclonamos en pBabepuro y las sobreexpresamos en dos líneas tumorales humanas, una de colon (HCT-116, en las que se deletionó p53 por doble recombinación homóloga) y un sarcoma (SAOS 2, defectivas para p53 y pRb) para analizar el posible efecto diferente de las distintas variantes de procesamiento alternativo (Figura 25A y 25B). En ambas líneas celulares, la sobreexpresión del fragmento SP1 redujo significativamente el número de colonias que eran capaces de crecer. Sin embargo, con SP0 (el cDNA completo), sólo se observaba un efecto moderado. (Figura 25A y 25B). Esto podría ser explicado por el hecho de que la proteína completa de PP1 α contiene un residuo (Thr320) que sufre fosforilación inhibitoria por CDKs (Liu et al., 1999), mientras que SP1, como codifica para una proteína más corta, no contiene este residuo, pese a mantener intacto el dominio serina/treonina fosfatasa. Estos resultados parecen concordar con los publicados por otros autores (Berndt et al., 1997), que muestran cómo un mutante constitutivamente activo de PP1 α , incapaz de ser inactivado por fosforilación, detiene el crecimiento celular en G1, mientras que el PP1 α silvestre, al sufrir una fosforilación inhibitoria por las CDKs, no detiene el crecimiento celular.

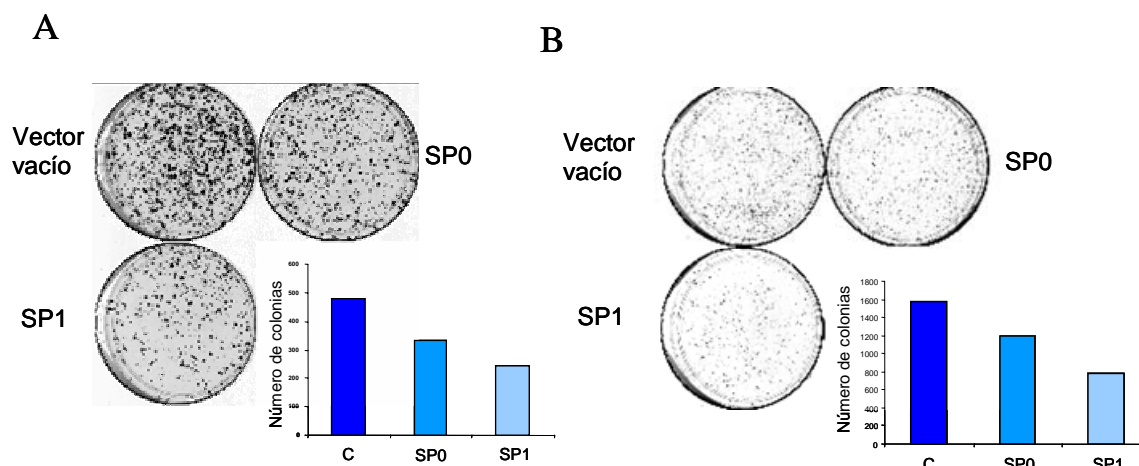


Figura 25: Efecto de la sobreexpresión de las diferentes variantes de procesamiento alternativo de *ppp1ca* en dos líneas tumorales humanas. A) La variante SP1 redujo significativamente el crecimiento de colonias en las células HCT-116 p53^{-/-}. La variante SP0 mostraba sólo un ligero efecto en la reducción del número de colonias. La imagen mostrada es representativa de diferentes experimentos independientes, con resultados similares. **B)** El mismo efecto se observó en las células SAOS 2. La imagen mostrada es representativa de diferentes experimentos independientes, con resultados similares.

El efecto inhibitor del crecimiento no se observó tampoco cuando las variantes SP3, SP5 y SP6 fueron sobreexpresadas (datos no mostrados), definiendo por tanto, en SP1, la longitud mínima de proteína necesaria para causar el efecto descrito previamente.

Hemos observado el efecto inhibitor del crecimiento al sobreexpresar SP1 tanto en células HCT-116 p53^{-/-} (que tienen pRb) como en células SAOS 2 (que no tienen p53 ni pRb), lo que nos hace pensar que aunque la parada del crecimiento inducida por PP1 α dependiera de su efecto sobre pRb, debe existir otra conexión entre PP1 α y el proceso de apoptosis, que implique la desfosforilación de alguna otra proteína distinta de pRb. Este hecho ha sido remarcado previamente por otros autores (Berndt et al., 1997), y además es consistente con otros estudios que muestran que PP1 α desfosforila y activa a Bad (Ayllon et al., 2000) y a caspasa 9 (Dessauge et al., 2006) para inducir apoptosis.

DISCUSIÓN

7.DISCUSIÓN

7.1. JUSTIFICACIÓN, VALIDACIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES DEL RASTREO GENÉTICO.

La senescencia celular ha sido propuesta como un mecanismo supresor tumoral, paralelo al de la apoptosis (Roninson, 2002; Serrano et al., 1997). La mayoría de los tumores en sus estadios tardíos muestran un fenotipo inmortal, como consecuencia de haber evadido las defensas naturales que poseen las células normales para evitar su transformación en células cancerosas. Estos tumores muestran alteraciones en genes implicados en esas vías. Por lo tanto, el conocimiento básico sobre estos procesos podría ser útil en el tratamiento del cáncer.

Nuestro rastreo genético, extendido a todo el genoma, pretendía encontrar genes cuya ausencia de función estuviera implicada en la anulación de la senescencia celular inducida por *p53* y el oncogén *ras*. El hecho de haber identificado al propio *p53* (dos veces, de forma independiente) en el rastreo genético, representaba una validación contundente del mismo.

Además, al usar células nulas para *p21Cip1* en el rastreo genético primario, esperábamos encontrar genes novedosos que actuaran independientemente de esta bien conocida diana de *p53*.

Una validación adicional nos la proporcionó el hecho de haber encontrado genes que, durante el periodo de tiempo que duró nuestra investigación, han sido caracterizados por otros grupos en su relación con *p53*, tal como *14-3-3 gamma* (Jin et al., 2006).

Podemos extraer ciertas conclusiones generales del tipo de rastreo genético que hemos llevado a cabo para silenciar la expresión de genes, usando un vector retroviral con fragmentos representativos de todo el genoma, clonados en antisentido. La primera es acerca del tamaño medio de los fragmentos positivos. Éste era de 146 nucleótidos, encontrándose el 75% de los mismos por debajo de los 160 nucleótidos, coincidiendo con el tamaño descrito previamente como el más efectivo en el silenciamiento génico (Carnero et al., 2000). Otra conclusión que puede derivarse del análisis de la distribución de los fragmentos antisentido a lo

largo de los diferentes ARN mensajeros, es que éstos se distribuyen a lo largo de todo el mensajero, incluyendo por supuesto la zona codificante, pero también las zonas no codificantes 5' y 3', siendo especialmente abundantes en esta última. El hecho de que el 27% de los fragmentos antisentido se localizaran en la zona 3' no codificante, parece apoyar la hipótesis anteriormente planteada (Carnero et al., 2000), acerca de que el mecanismo de acción de los fragmentos antisentido se basaría más en la inhibición de la traducción de los genes determinados, que en la degradación de los ARNm. Sin embargo, este punto debería ser confirmado experimentalmente.

7.2. RELACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES Y p53.

La biogénesis ribosomal consume una parte importante de la energía y recursos de la célula y juega un papel fundamental en el ciclo de vida celular (Conlon y Raff, 1999; Neufeld y Edgar, 1998; Warner, 1999). El ribosoma completo, compuesto de cuatro especies de ARNr y aproximadamente 75 proteínas ribosomales distribuidas entre dos subunidades de 40S y 60S, se ensambla en el nucleolo. La subunidad ribosomal 40S madura contiene el ARNr 18S y aproximadamente 32 proteínas ribosomales, mientras que la subunidad 60S está compuesta de los ARNr 5S, 5.8S y 25-28S y aproximadamente 45 proteínas ribosomales (Kressler et al., 1999; Venema y Tollervey, 1999). El ensamblaje correcto de cada subunidad ribosomal requiere la coordinación de varios eventos, incluyendo la síntesis e importación al núcleo de las proteínas ribosomales, la síntesis y procesamiento de los ARNr, y el ensamblaje concomitante de las proteínas ribosomales en las subunidades pre-ribosomales. Presumiblemente, cualquier perturbación de la biogénesis ribosomal tendría un efecto relevante en la célula. Por ello, debe existir en todos los organismos multicelulares un sistema de control para coordinar la división celular y el crecimiento celular. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo las células coordinan la biogénesis ribosomal y el ciclo celular.

Nosotros hemos identificado 14 proteínas ribosomales diferentes cuya pérdida de función evita la parada de crecimiento inducida por p53. La expresión de los fragmentos antisentido contra estas RPs redujo la actividad transcripcional de p53. Nuestros datos sugieren que el efecto está mediado a través del control de la

traducción del ARNm de p53. Sin embargo, las diferencias en la respuesta a la ausencia de diferentes RPs, entre células con o sin *mdm2*, sugiere que otro mecanismo relacionado con Mdm2 podría co-existir.

El correcto ensamblaje ribosomal es fundamental para la salud celular. Por lo tanto, es lógico pensar que la alteración de este mecanismo requiera una respuesta que prevenga que las células sigan creciendo, y que desemboque en parada del ciclo celular o apoptosis. Considerando que la mayoría de las situaciones de estrés celular están controladas por p53, no es de extrañar que también la respuesta a estrés por biogénesis ribosomal esté mediada por este regulador esencial.

Nuestros datos indican que el estrés causado por la inhibición parcial de la síntesis de las RPs, conlleva la inhibición específica de la traducción del ARNm de p53, independientemente de Mdm2. Estos datos están, por lo tanto, de acuerdo con los de Takagi y colaboradores, que mostraban que la inhibición parcial de L26 causa una clara disminución en la traducción de p53 (Takagi et al., 2005). Estos autores también defienden que la región 5' no codificante del ARNm de p53 es esencial para la regulación de la traducción de p53 tras daño en el DNA por la proteína ribosomal L26. Nuestros datos coinciden con esa hipótesis. El ARNm completo de p53, incluyendo la región no codificante 5', no produjo proteína de p53 en la presencia de los fragmentos antisentido de RPs, en células nulas para *mdm2*. Aunque no podemos descartar que puedan actuar otros mecanismos desconocidos para la degradación de p53 en ausencia de Mdm2, sólo observábamos este efecto en la presencia de los fragmentos antisentido de las RPs y por lo tanto apoyamos la hipótesis de la regulación traduccional específica.

Es tentador especular con la idea de que la disminución en los niveles de algunas proteínas ribosomales pudiera contribuir a la tumorigénesis disminuyendo el nivel de la proteína p53. Sin embargo, raramente encontramos una pérdida total del ARNm de las proteínas ribosomales, indicando que las RPs son esenciales, y sólo cuando co-existen otras alteraciones, puede mantenerse en el tumor la disminución de las mismas.

Amsterdam y colaboradores mostraron que muchos genes de RPs pueden actuar como genes supresores tumorales en haploinsuficiencia en el pez cebra (*Danio rerio*) (Amsterdam et al., 2004). Ellos identificaron doce líneas de peces con elevada incidencia de cáncer. Los peces de estas líneas desarrollaban tumores

malignos de la vaina de nervios periféricos y en algunos casos también otros tipos de tumores, con frecuencias variables, de moderadas a muy altas. Once de las doce líneas eran heterocigotas para una mutación en diferentes genes de RPs. El descubrimiento de estos autores sugiere que muchos genes de RPs pueden actuar como supresores tumorales haploinsuficientes en el pez cebra. Ellos sostienen la posibilidad de que sea una función compartida, asociada al ribosoma, la que les permite ser supresores tumorales, indicando que la reducción en la síntesis proteica pueda conllevar la reducción en el nivel de una proteína supresora tumoral crítica. Nuestros datos concuerdan con los de Amsterdam y colaboradores y con su hipótesis.

Hasta ahora, sin embargo, no existían evidencias directas sobre el papel de las RPs como supresores tumorales en mamíferos. Sólo dos trabajos describían este papel en la bibliografía. En un estudio en ratón, se encontró que dos líneas celulares tumorales murinas independientes expresaban antígenos tumorales que eran, de hecho, RPs mutadas (Beck-Engeser et al., 2001). En ambos casos, se encontró que los tumores se volvían más agresivos tras la pérdida o la mutación del alelo silvestre del gen de la RP correspondiente. Por otro lado, en humanos, aproximadamente el 25% de los casos esporádicos o familiares de anemia de Diamond-Blackfan (este síndrome implica un riesgo aumentado de leucemia) están asociados con una mutación en S19 (Draptchinskaia et al., 1999).

En nuestro trabajo, un pequeño porcentaje de tumores mostraba una reducción del 50% en los niveles de ARNm de ciertas RPs, comparado con el tejido normal del mismo paciente. Sin embargo, la reducción del 100% no se observó en ninguna muestra. Estos datos indicarían que si las RPs tienen un papel como supresores tumorales, éste será en haploinsuficiencia, como ha sido descrito previamente en el modelo del pez cebra (Amsterdam et al., 2004).

Aunque ciertamente encontramos un alto porcentaje de tumores mostrando un incremento en las RPs en el tejido tumoral, coincidente con lo descrito previamente (Ruggero y Pandolfi, 2003), lo que realmente llama la atención es que también fuéramos capaces de encontrar tumores con reducciones en algunas proteínas ribosomales específicas. Y es que es posible que la biogénesis ribosomal pueda influir sobre la carcinogénesis de dos formas opuestas. Por un lado, una tasa metabólica aumentada conlleva una biogénesis ribosomal aumentada, y éste sería

un efecto de la transformación tumoral. Pero por otro lado, el estrés ribosomal estaría conectado con p53 por dos mecanismos distintos. En uno de ellos, sugerido para L23, L11 y L5, la sobreexpresión de estas RPs anularía la degradación de p53 inducida por Mdm2. Alternativamente, la disminución en los niveles de L26, así como de las RPs estudiadas en nuestro trabajo, principalmente inhibiría la traducción de p53.

7.3. RELACIÓN ENTRE SLK, CINP, ATX, BRCAA1, MYBBP1A Y p53.

Hemos observado que la pérdida de función de estas cinco proteínas evitaba parcialmente la parada del crecimiento inducida por p53. En un intento de dilucidar cómo se relacionaban estas proteínas con p53, analizamos cómo se veía afectada la actividad transcripcional de p53, en presencia de fragmentos antisentido contra estos genes. Vimos que la expresión de algunos de estos fragmentos (en concreto, los de SKL, BRCAA1 y ATX), reducía la actividad transcripcional de p53. Sin embargo, cuando analizamos el efecto de los fragmentos antisentido de estos cinco genes en la respuesta de p53 frente a daño en el DNA inducido por doxorubicina, observamos que ninguno de ellos estaba afectando a la activación transcripcional de p21. Siguiendo con la caracterización de la relación entre p53 y estos genes, nos preguntábamos si la expresión de alguno de ellos era directamente dependiente de p53. Sólo *mybbp1a*, *atx* y *brcaa1* parecían estar transcripcionalmente modulados por p53 y de manera muy leve.

Uno de estos genes (*atx* o *hSmg1*) ha sido caracterizado por otros grupos en su relación con p53 durante el periodo de tiempo que duró nuestra investigación (Abraham, 2004; Brumbaugh et al., 2004), hecho que de alguna forma representa una validación de nuestros resultados. Estos autores han descrito a *hSmg1* como una quinasa que fosforila a p53 como respuesta a estrés por luz ultravioleta o infrarrojos.

En la figura 26 mostramos cómo estos cinco genes identificados podrían estar interviniendo en la respuesta de p53, ya sea modulando al propio p53, interfiriendo en su actividad transcripcional o afectando más indirectamente a la parada del ciclo celular inducida por él. No obstante, para poder adscribir de forma concluyente estos genes a algún sitio de actuación concreto, necesitaríamos realizar más

experimentos. Además, estas posibilidades no tienen por qué ser excluyentes entre sí.

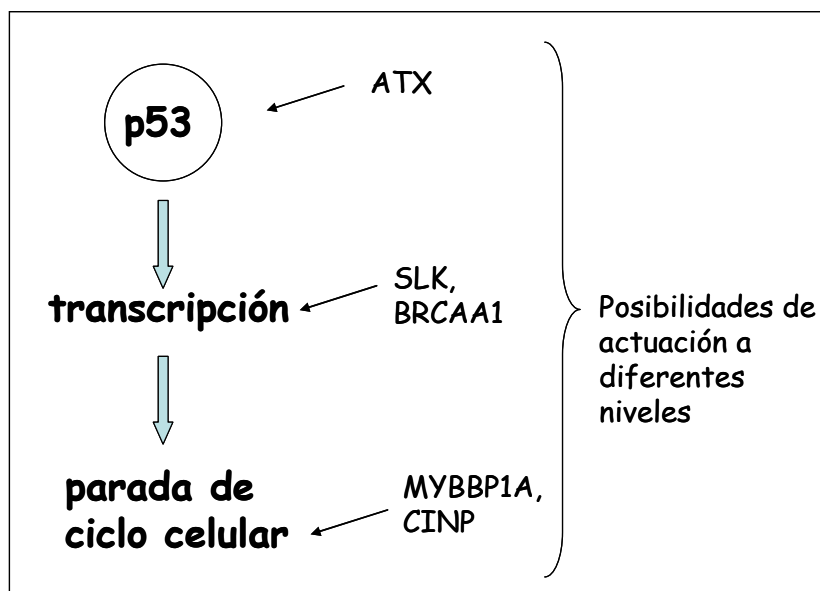


Figura 26: Propuesta de posibilidades de actuación de los 5 genes. ATX es una quinasa capaz de fosforilar a p53. Los fragmentos antisentido contra SLK y BRCA1 reducen la actividad transcripcional de p53. Los fragmentos antisentido contra MYBBP1A y CINP han demostrado funcionalmente evitar la parada de ciclo celular inducida por p53.

Al estar relacionadas con el bien conocido supresor tumoral p53, de forma que la pérdida de función de estas cinco proteínas evitaba la parada del crecimiento inducida por p53, era interesante plantearnos la hipótesis de que la reducción en los niveles de estas proteínas pudiera contribuir a la tumorigénesis. Para verificar esta hipótesis, analizamos la expresión de estos genes en líneas celulares tumorales establecidas en el laboratorio. Vimos que la expresión de algunos de estos genes estaba perdida en algunas líneas celulares de sarcoma (Figura 16), lo que nos impulsó a seguir analizando lo que ocurría en tumores. De hecho, la expresión de algunos de estos genes estaba reducida en algunos tumores con respecto al tejido no tumoral del mismo paciente (Figura 17). Nuestros datos apoyan el papel de los genes identificados, como supresores tumorales. Sin embargo, sería necesario realizar un estudio a nivel molecular para poder establecer cómo realizan esta función.

7.4. RELACIÓN ENTRE PPP1CA, p53, RAS y CERAMIDAS.

En nuestro rastreo genético recuperamos dos veces, de forma independiente, un fragmento antisentido contra *ppp1ca* (subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa), lo que indicaba que este fragmento antisentido era capaz de facilitar la evasión de la parada de crecimiento inducida por *p53* y *ras*, en MEFs.

La subunidad catalítica de PP1 (PP1c) consta de cuatro isoformas (α , β , $\gamma 1$, $\gamma 2$) que se pueden unir a muchas proteínas celulares que funcionan como subunidades reguladoras (Damer et al., 1998). Estas subunidades modifican la actividad de PP1 o la dirigen a sustratos determinados. Por lo tanto, la subunidad catalítica de PP1 se encuentra raramente sola en la naturaleza, siendo más común la existencia de las estructuras formadas por oligomerización de la subunidad catalítica con subunidades reguladoras. La ventaja biológica de esto es proporcionar múltiples vías para la inhibición, regulación o dirección de la actividad de PP1, en respuesta a estímulos transductores de señales. Gracias a la existencia de múltiples subunidades reguladoras que pueden ser modificadas individualmente, la actividad de PP1 puede ser regulada rápida y decisivamente (Rubin et al., 1998). En este sentido, existe una regulación diferente de la actividad fosfatasa dirigida a pRb, cuando las células están progresando a través del ciclo celular o cuando las células están sometidas a estrés. Por ejemplo, la asociación PP1-PNUTS (fosfatasa 1-subunidad que dirige a la fosfatasa 1 al núcleo) persiste mientras las células progresan a través del ciclo celular, pero durante el estrés celular, PNUTS se disocia de PP1, y como consecuencia, pRb (Thr-821) es desfosforilado (Krucher et al., 2006).

PP1 α (heterodímero compuesto por la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa, *ppp1ca*, y por una subunidad reguladora) tiene el potencial de detener el crecimiento celular en G1, a menos que él mismo sea inactivado por fosforilación periódica en la Thr320, presumiblemente por las CDKs que regulan la transición celular G1-S. De hecho, un mutante constitutivo de PP1 α , T320A, lo es por ser resistente a esa fosforilación inhibitoria. Este mutante causa parada en G1 dependiente de pRb en células cancerosas humanas (Berndt et al., 1997).

La reducción en los niveles de Ppp1ca provocaría un defecto en la desfosforilación de pRb, manteniendo esta proteína hiperfosforilada incluso en condiciones de activación de p53, y permitiendo por tanto la proliferación celular.

Esto es lo que hemos observado en nuestro sistema (Figura 20C). Además, esto se ha visto corroborado con el experimento contrario, el de la sobreexpresión de *ppp1ca*, que provocaba la parada del crecimiento en líneas tumorales humanas (Figura 25).

Por otro lado, el oncogén *ras* promueve un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas en nuestro sistema. Ya hemos resaltado anteriormente que las ceramidas tienen un papel importante como moléculas señalizadoras en procesos como la parada del ciclo celular o la apoptosis, que ocurren como consecuencia del estrés celular. Además, para la inducción de estas respuestas bastaba con un simple incremento en la concentración de ceramida endógena (Hannun y Luberto, 2000).

Aunque el desconocimiento sobre la señalización hacia senescencia mediada por lípidos es grande, dos hechos parecen otorgar a las ceramidas un papel relevante en este proceso. Por un lado, las ceramidas endógenas están incrementadas en las células senescentes (Venable et al., 1995). Por otro lado, los fibroblastos humanos diploides jóvenes adquirirían un fenotipo senescente tras la adición de ceramida exógena (Venable et al., 1995).

Considerando que la ceramida es capaz de inducir hipofosforilación de pRb, conllevando parada del crecimiento y senescencia celular; y que la ceramida activaba tanto a la proteína fosfatasa 1 como a la proteína fosfatasa 2A (Lee et al., 2000), podemos suponer que la inducción de la hipofosforilación de pRb por ceramida está mediada, al menos en parte, por Ppp1ca. Esto, además, concuerda perfectamente con el hecho de que la hipofosforilación de pRb inducida por ceramida se inhibe selectivamente con inhibidores de PP1 (Hannun y Luberto, 2000; Kishikawa et al., 1999; Ruvolo, 2003).

Hemos visto que el oncogén *ras* es capaz de promover un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas, así como de la proteína de Ppp1ca (Figura 21A y 19B). Nosotros proponemos que el oncogén *ras* podría ser uno de los agentes de estrés que causan la acumulación de ceramidas endógenas en las células durante senescencia y que éstas son un importante elemento regulador, a través de Ppp1ca. Este último punto también fue confirmado experimentalmente en nuestro trabajo, ya que con la adición de ceramida exógena indujimos senescencia celular, y este fenotipo fue abolido con el silenciamiento de *ppp1ca* mediante ARN de interferencia.

Este hecho apoya nuestra hipótesis de la relación entre ceramidas, Ppp1ca y senescencia (Figura 28). En concreto, el ARN de interferencia de *ppp1ca* impediría la desfosforilación de pRb inducida por ceramidas, y por tanto, evitaría la senescencia.

Sin embargo, también observábamos una disminución en el número de células en MEFs p53^{-/-};ts transducidos con el shRNA de *ppp1ca*. Este efecto puede explicarse considerando que las ceramidas activan caspasas (que median su efecto en apoptosis) y pRb (que media su efecto en la progresión del ciclo celular) (Figura 27A). Así, por ejemplo, en células que sobreexpresaran bcl-2, las ceramidas no serían capaces de activar caspasas e inducir apoptosis, pero retendrían la habilidad de activar pRb y causar parada del ciclo celular. Y al contrario, en células en las que pRb estuviera ausente o inactivo, las ceramidas no serían capaces de inducir parada de ciclo celular en G0-G1, pero retendrían su habilidad de inducir apoptosis (Hannun y Luberto, 2000). Quizá el caso de los MEFs p53^{-/-};ts transducidos con el shRNA de *ppp1ca* se corresponda con la situación en la que se interrumpe la parada de crecimiento inducida por ceramidas, pero aún se permite la apoptosis inducida por ceramidas (figura 27B) y eso explicaría la reducción del número total de células.

La sobreexpresión de un fragmento de *ppp1ca* que codifica para una proteína que mantiene intacto el dominio serina/treonina fosfatasa, pero sin la región de la proteína que sufre inactivación por fosforilación (la variante de procesamiento alternativo SP1), redujo el número de colonias capaces de crecer en dos líneas tumorales humanas. Estos resultados concuerdan con lo publicado por otros autores (Berndt et al., 1997), que muestran cómo un mutante constitutivamente activo de PP1 α , incapaz de ser inactivado por fosforilación, detenía el crecimiento celular en G1.

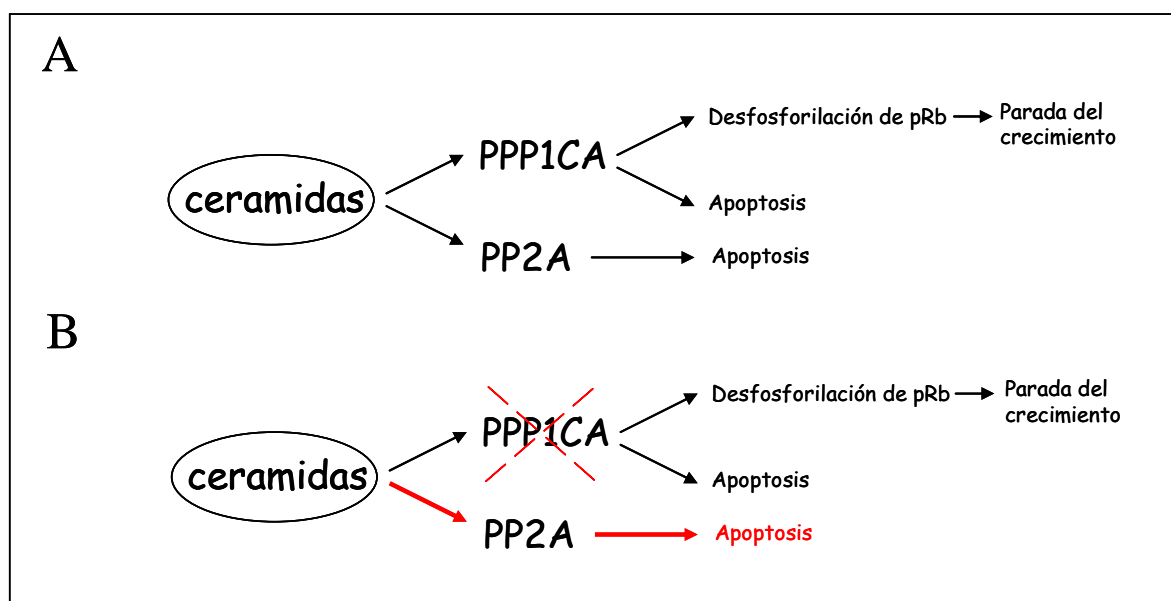


Figura 27: Las ceramidas inducen tanto parada del crecimiento como apoptosis. A) Las ceramidas pueden inducir tanto parada del ciclo celular (a través de la desfosforilación de pRb por PPP1CA) como apoptosis (a través de PPP1CA y PP2A). **B)** Cuando la señalización vía PPP1CA está interrumpida, la señalización hacia apoptosis vía PP2A constituiría la respuesta predominante.

Una de las líneas celulares en las que Ppp1ca redujo el número de colonias capaces de crecer, era nula para el gen *rb1*, lo que remarca la idea de que además del efecto ya descrito sobre la fosforilación de pRb (Nelson et al., 1997), y cuya existencia también hemos comprobado nosotros en nuestro sistema, Ppp1ca debe mediar la inhibición del crecimiento a través de otras dianas.

En nuestros experimentos también hemos observado cierta estabilización de la proteína Ppp1ca por p53. Además, en la caracterización del efecto del fragmento antisentido de *ppp1ca* en la respuesta de p53 tras daño en el DNA, pudimos observar que este fragmento antisentido no estaba afectando a la estabilidad de p53, pero que sí afectaba negativamente a la inducción de p21. Pero como las dos líneas celulares en las que Ppp1ca redujo el número de colonias capaces de crecer eran nulas para *p53*, aún debe existir alguna otra diana, distinta de pRb y de p53, a través de la que Ppp1ca pueda mediar su efecto de inhibición del crecimiento.

Esto está totalmente de acuerdo con los estudios que muestran que PP1 α desfosforila y activa a Bad (Ayllon et al., 2000) y caspasa 9 (Dessauge et al., 2006) para inducir apoptosis.

Finalmente, aunque la calificación de un gen como supresor tumoral requiere que el mismo satisfaga varios criterios, nuestros datos, al menos, parecen apuntar

hacia esa dirección. Nuestros resultados relacionan a *ppp1ca* con la parada de crecimiento inducida por *p53* y *ras*, además de con la reducción del crecimiento de colonias en líneas tumorales humanas. También observamos una reducción significativa de la expresión de este gen en algunos casos de tumores de pulmón. La supuesta relación entre la alteración de este gen y la carcinogénesis de pulmón se ve apoyada por un estudio que muestra que la expresión de *ppp1ca* está significativamente disminuida en una metástasis de pulmón con respecto al adenocarcinoma (Garber et al., 2001). Los trabajos de otros autores que han relacionado a Ppp1ca con apoptosis (Ayllon et al., 2000; Dessauge et al., 2006) e incluso un trabajo muy reciente que defiende que la actividad de la proteína fosfatasa 1 α previene la transformación oncogénica (Liu et al., 2006), también apoyarían la idea de que *ppp1ca* pueda actuar como un supresor tumoral.

La Figura 28 resume nuestra hipótesis, en la que el estrés ocasionado por el oncogén *ras* activaría a Ppp1ca, a través de un aumento en los niveles endógenos de ceramidas, manteniendo a pRb hipofosforilado, complementando así el papel de p53 en la parada del ciclo celular.

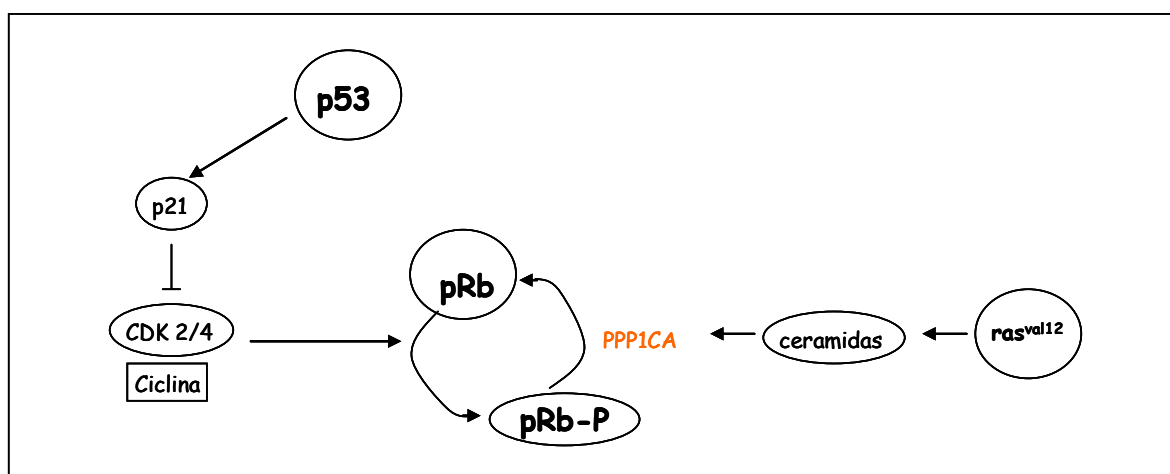


Figura 28: Visión general de nuestra hipótesis. El estrés causado por el oncogén *ras*, a través de un aumento en los niveles endógenos de ceramidas, activa a PPP1CA. Como consecuencia, pRb queda hipofosforilado, complementando el papel de p53 en la parada del ciclo celular.

CONCLUSIONES

8.CONCLUSIONES

1. La expresión del oncogén *ras* en presencia de p53 activo cambia las propiedades de la parada celular reversible a senescencia irreversible. Este efecto es independiente de p21.
2. En el rastreo genético extendido a todo el genoma, para la identificación de genes cuya ausencia de función estuviera implicada en la anulación de la senescencia celular inducida por p53 y el oncogén *ras*, el 75% de los fragmentos identificados eran menores de 160 nucleótidos. El análisis de la distribución de los diferentes fragmentos, demostró que se distribuían por todo el ARNm, incluyendo las zonas 5' y 3' no codificantes, siendo especialmente abundantes en esta última.
3. Entre los fragmentos identificados se encontraba un grupo de proteínas ribosomales. La expresión de los fragmentos antisentido contra esas proteínas ribosomales reducía la actividad transcripcional de p53. Nuestros datos sugieren que el efecto está mediado a través del control de la traducción del ARNm de p53.
4. Otros genes identificados porque su ausencia de función evitaba la senescencia inducida por p53 y el oncogén *ras* fueron *slk*, *cinp*, *atx*, *brcaa1* y *mybbp1a*. El hecho de que la expresión de estos genes estuviera perdida en líneas celulares tumorales y en tumores, parece apoyar la hipótesis de que pudieran comportarse como potenciales supresores tumorales.
5. Otro gen identificado en el rastreo genético es *ppp1ca*, la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1, isoforma alfa. La reducción en los niveles de Ppp1ca origina un defecto en la desfosforilación de pRb, manteniendo a esta proteína hiperfosforilada, incluso en condiciones de activación de p53, permitiendo así la proliferación celular. Por el contrario,

la sobreexpresión de *ppp1ca* (sobre todo de la variante de procesamiento alternativo SP1) reduce el crecimiento de líneas tumorales humanas. La reducción significativa de la expresión de *ppp1ca* en algunos casos de tumores de pulmón apoyaría la idea de que este gen pudiera actuar como supresor tumoral.

6. El oncogén *ras* promueve un incremento en los niveles intracelulares de ceramidas, así como de la proteína Ppp1ca.
7. La adición de ceramida exógena induce senescencia celular, y se previene la aparición de este fenotipo con el silenciamiento de *ppp1ca* mediante ARN de interferencia. Por lo tanto el oncogén *ras* podría ser uno de los agentes de estrés que causan la acumulación de ceramidas endógenas en las células durante senescencia, siendo éstas importantes moléculas reguladoras, a través de Ppp1ca.

BIBLIOGRAFÍA

9.BIBLIOGRAFÍA

Abraham, R. T. (2004). The ATM-related kinase, hSMG-1, bridges genome and RNA surveillance pathways. *DNA Repair (Amst)* 3, 919-925.

Alberts, A. S., Thorburn, A. M., Shenolikar, S., Mumby, M. C. y Feramisco, J. R. (1993). Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 388-392.

Amsterdam, A., Sadler, K. C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R. T., Lees, J. A. y Hopkins, N. (2004). Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* 2, E139.

Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. y Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19, 1751-1758.

Ashcroft, M., Taya, Y. y Vousden, K. H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20, 3224-3233.

Ayllon, V., Martinez, A. C., Garcia, A., Cayla, X. y Rebollo, A. (2000). Protein phosphatase 1alpha is a Ras-activated Bad phosphatase that regulates interleukin-2 deprivation-induced apoptosis. *Embo J* 19, 2237-2246.

Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.

Bates, S., Ryan, K. M., Phillips, A. C. y Vousden, K. H. (1998). Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* 17, 1691-1703.

Beck-Engeser, G. B., Monach, P. A., Mumberg, D., Yang, F., Wanderling, S., Schreiber, K., Espinosa, R., 3rd, Le Beau, M. M., Meredith, S. C. y Schreiber, H. (2001). Point mutation in essential genes with loss or mutation of the second allele: relevance to the retention of tumor-specific antigens. *J Exp Med* 194, 285-300.

Berndt, N., Dohadwala, M. y Liu, C. W. (1997). Constitutively active protein phosphatase 1alpha causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr Biol* 7, 375-386.

Bode, A. M. y Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T. y Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.

Bringold, F. y Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35, 317-329.

Brumbaugh, K. M., Otterness, D. M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R. S., Maquat, L. E. y Abraham, R. T. (2004). The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol Cell* 14, 585-598.

Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11, S27-31.

Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.

Carnero, A., Hudson, J. D., Hannon, G. J. y Beach, D. H. (2000). Loss-of-function genetics in mammalian cells: the p53 tumor suppressor model. *Nucleic Acids Res* 28, 2234-2241.

Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. y Hannun, Y. A. (1999). Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 274, 20313-20317.

Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K. y Roninson, I. B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 3761-3767.

Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y. y Lee, W. H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58, 1193-1198.

Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725-730.

Chiang, C. W., Kanies, C., Kim, K. W., Fang, W. B., Parkhurst, C., Xie, M., Henry, T. y Yang, E. (2003). Protein phosphatase 2A dephosphorylation of phosphoserine 112 plays the gatekeeper role for BAD-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 23, 6350-6362.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Conlon, I. y Raff, M. (1999). Size control in animal development. *Cell* 96, 235-244.
Dai, C. Y. y Enders, G. H. (2000). p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene* 19, 1613-1622.

- Dai, M. S. y Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 279, 44475-44482.
- Dai, M. S., Zeng, S. X., Jin, Y., Sun, X. X., David, L. y Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654-7668.
- Damer, C. K., Partridge, J., Pearson, W. R. y Haystead, T. A. (1998). Rapid identification of protein phosphatase 1-binding proteins by mixed peptide sequencing and data base searching. Characterization of a novel holoenzymic form of protein phosphatase 1. *J Biol Chem* 273, 24396-24405.
- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J. y Lowe, S. W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-2442.
- Deng, X., Ito, T., Carr, B., Mumby, M. y May, W. S., Jr. (1998). Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 273, 34157-34163.
- Dessaige, F., Cayla, X., Albar, J. P., Fleischer, A., Ghadiri, A., Duhamel, M. y Rebollo, A. (2006). Identification of PP1alpha as a caspase-9 regulator in IL-2 deprivation-induced apoptosis. *J Immunol* 177, 2441-2451.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Dilley, T. K., Bowden, G. T. y Chen, Q. M. (2003). Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp Cell Res* 290, 38-48.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. y *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-9367.
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., *et al.* (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169-175.
- Du, W. y Pogoriler, J. (2006). Retinoblastoma family genes. *Oncogene* 25, 5190-5200.
- el-Deiry, W. S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8, 345-357.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Lin, A. W., Querido, E., McCurrach, M. E., Hannon, G. J. y Lowe, S. W. (2002). Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3497-3508.

Folkman, J. (2006). Tumor suppression by p53 is mediated in part by the antiangiogenic activity of endostatin and tumstatin. *Sci STKE* 2006, pe35.

Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* 421, 436-440.

Ganguli, G. y Wasylyk, B. (2003). p53-independent functions of MDM2. *Mol Cancer Res* 1, 1027-1035.

Garber, M. E., Troyanskaya, O. G., Schluens, K., Petersen, S., Thaesler, Z., Pacyna-Gengelbach, M., van de Rijn, M., Rosen, G. D., Perou, C. M., Whyte, R. I., *et al.* (2001). Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13784-13789.

Goodrich, D. W. (2006). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 25, 5233-5243.

Gottlieb, T. M., Leal, J. F., Seger, R., Taya, Y. y Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* 21, 1299-1303.

Hahn, W. C. y Weinberg, R. A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-1603.

Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401, 1-11.

Hanahan, D. y Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hannon, G. J., Sun, P., Carnero, A., Xie, L. Y., Maestro, R., Conklin, D. S. y Beach, D. (1999). MaRX: an approach to genetics in mammalian cells. *Science* 283, 1129-1130.

Hannun, Y. A. (1996). Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274, 1855-1859.

Hannun, Y. A. y Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10, 73-80.

Harmala-Brasken, A. S., Mikhailov, A., Soderstrom, T. S., Meinander, A., Holmstrom, T. H., Damuni, Z. y Eriksson, J. E. (2003). Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness. *Oncogene* 22, 7677-7686.

- Harrington, E. A., Bruce, J. L., Harlow, E. y Dyson, N. (1998). pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11945-11950.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. y Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Helmbold, H., Deppert, W. y Bohn, W. (2006). Regulation of cellular senescence by Rb2/p130. *Oncogene* 25, 5257-5262.
- Hjerrild, M., Milne, D., Dumaz, N., Hay, T., Issinger, O. G. y Meek, D. (2001). Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells. *Biochem J* 355, 347-356.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M. S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. y Harris, C. C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22, 3551-3555.
- Honda, R., Tanaka, H. y Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.
- Jacks, T. y Weinberg, R. A. (1996). Cell-cycle control and its watchman. *Nature* 381, 643-644.
- Jeffrey, P. D., Gorina, S. y Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-1502.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K. y Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 24, 7669-7680.
- Jin, Y., Dai, M. S., Lu, S. Z., Xu, Y., Luo, Z., Zhao, Y. y Lu, H. (2006). 14-3-3gamma binds to MDMX that is phosphorylated by UV-activated Chk1, resulting in p53 activation. *Embo J* 25, 1207-1218.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G. y Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
- Kapic, A., Helmbold, H., Reimer, R., Klotzsche, O., Deppert, W. y Bohn, W. (2006). Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ* 13, 324-334.
- Kishikawa, K., Chalfant, C. E., Perry, D. K., Bielawska, A. y Hannun, Y. A. (1999). Phosphatidic acid is a potent and selective inhibitor of protein phosphatase 1 and an inhibitor of ceramide-mediated responses. *J Biol Chem* 274, 21335-21341.

- Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110, 3-8.
- Kortlever, R. M., Higgins, P. J. y Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*.
- Kressler, D., Linder, P. y de La Cruz, J. (1999). Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7897-7912.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. y Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12072-12077.
- Krucher, N. A., Rubin, E., Tedesco, V. C., Roberts, M. H., Sherry, T. C. y De Leon, G. (2006). Dephosphorylation of Rb (Thr-821) in response to cell stress. *Exp Cell Res*.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N. y Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Lai, Z., Ferry, K. V., Diamond, M. A., Wee, K. E., Kim, Y. B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P. A., Copeland, R. A. y Auger, K. R. (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem* 276, 31357-31367.
- Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Howard, B. H. y Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274, 7936-7940.
- Lee, J. Y., Bielawska, A. E. y Obeid, L. M. (2000). Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp Cell Res* 261, 303-311.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Liu, C. W., Wang, R. H. y Berndt, N. (2006). Protein phosphatase 1alpha activity prevents oncogenic transformation. *Mol Carcinog* 45, 648-656.
- Liu, C. W., Wang, R. H., Dohadwala, M., Schonthal, A. H., Villa-Moruzzi, E. y Berndt, N. (1999). Inhibitory phosphorylation of PP1alpha catalytic subunit during the G(1)/S transition. *J Biol Chem* 274, 29470-29475.
- Lohrum, M. A., Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. y Vousden, K. H. (2000). Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol* 2, 179-181.
- Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M. y Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577-587.

- Lohrum, M. A., Woods, D. B., Ludwig, R. L., Balint, E. y Vousden, K. H. (2001). C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol* 21, 8521-8532.
- Lowe, S. W. y Ruley, H. E. (1993). Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* 7, 535-545.
- Ludlow, J. W., Glendening, C. L., Livingston, D. M. y DeCarprio, J. A. (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13, 367-372.
- Lundberg, A. S., Hahn, W. C., Gupta, P. y Weinberg, R. A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 12, 705-709.
- Lynch, C. J. y Milner, J. (2006). Loss of one p53 allele results in four-fold reduction of p53 mRNA and protein: a basis for p53 haplo-insufficiency. *Oncogene* 25, 3463-3470.
- Lynch, D. H. (1987). Oncogenes and cancer. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 15, 24-28.
- Maki, C. G., Huibregtse, J. M. y Howley, P. M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res* 56, 2649-2654.
- Malumbres, M. y Carnero, A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 5, 5-18.
- Martinez, J., Georgoff, I. y Levine, A. J. (1991). Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5, 151-159.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., *et al.* (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15, 1067-1077.
- Mayo, L. D. y Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11598-11603.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J. y Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
- Migliore, L. y Coppede, F. (2002). Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. *Mutat Res* 512, 135-153.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. y Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.

- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. y Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 113, 703-716.
- Nelson, D. A., Krucher, N. A. y Ludlow, J. W. (1997). High molecular weight protein phosphatase type 1 dephosphorylates the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 272, 4528-4535.
- Neufeld, T. P. y Edgar, B. A. (1998). Connections between growth and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 10, 784-790.
- Nevins, J. R., Leone, G., DeGregori, J. y Jakoi, L. (1997). Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* 173, 233-236.
- Nowell, P. C. (2002). Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 12, 261-266.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W. y Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-860.
- Olivera, A. y Spiegel, S. (1993). Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.
- Palmero, I., Pantoja, C. y Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-126.
- Pantoja, C. y Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-4982.
- Pestov, D. G., Strezoska, Z. y Lau, L. F. (2001). Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 21, 4246-4255.
- Poyatos, J. F. y Carnero, A. (2004). Non-neutral role of replicative senescence in tissue homeostasis and tumorigenesis. *J Theor Biol* 230, 333-341.
- Rajesh, D., Schell, K. y Verma, A. K. (1999). Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. *Mol Pharmacol* 56, 515-525.
- Reynolds, C. P., Maurer, B. J. y Kolesnick, R. N. (2004). Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 206, 169-180.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. y Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 20, 8458-8467.

Roninson, I. B. (2002). Tumor senescence as a determinant of drug response in vivo. *Drug Resist Updat* 5, 204-208.

Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T. y Levine, A. J. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J* 17, 554-564.

Rubin, E., Tamrakar, S. y Ludlow, J. W. (1998). Protein phosphatase type 1, the product of the retinoblastoma susceptibility gene, and cell cycle control. *Front Biosci* 3, D1209-1219.

Ruggero, D. y Pandolfi, P. P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3, 179-192.

Ruvolo, P. P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 47, 383-392.

Sage, J., Miller, A. L., Perez-Mancera, P. A., Wysocki, J. M. y Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* 424, 223-228.

Sager, R. (1989). Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science* 246, 1406-1412.

Santarosa, M. y Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654, 105-122.

Scarpelli, D. G. (1983). Recent developments toward a unifying concept of carcinogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 13, 249-259.

Schmitt, C. A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 286-295.

Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M. y Lowe, S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 109, 335-346.

Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R. A., Beach, D. y Bar-Sagi, D. (1995). Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 267, 249-252.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. y Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

Sherr, C. J. y DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.

Sherr, C. J. y McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.

Shirangi, T. R., Zaika, A. y Moll, U. M. (2002). Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *Faseb J* 16, 420-422.

Steinmeyer, K., Maacke, H. y Deppert, W. (1990). Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* 5, 1691-1699.

Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B. A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., *et al.* (2007). PRAK Is Essential for ras-Induced Senescence and Tumor Suppression. *Cell* 128, 295-308.

Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G. y Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. *Cell* 123, 49-63.

Tao, W. y Levine, A. J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6937-6941.

Testa, J. R. y Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10983-10985.

Timmermann, S., Hinds, P. W. y Munger, K. (1998). Re-expression of endogenous p16ink4a in oral squamous cell carcinoma lines by 5-aza-2'-deoxycytidine treatment induces a senescence-like state. *Oncogene* 17, 3445-3453.

Venable, M. E., Lee, J. Y., Smyth, M. J., Bielawska, A. y Obeid, L. M. (1995). Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem* 270, 30701-30708.

Venema, J. y Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261-311.

Vogelstein, B. y Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.

Wang, Y., Blandino, G., Oren, M. y Givol, D. (1998). Induced p53 expression in lung cancer cell line promotes cell senescence and differentially modifies the cytotoxicity of anti-cancer drugs. *Oncogene* 17, 1923-1930.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.

Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J. y Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.

- Xirodimas, D. P., Stephen, C. W. y Lane, D. P. (2001). Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. *Exp Cell Res* 270, 66-77.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. y Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.
- Zhang, R., Poustovoitov, M. V., Ye, X., Santos, H. A., Chen, W., Daganzo, S. M., Erzberger, J. P., Serebriiskii, I. G., Canutescu, A. A., Dunbrack, R. L., *et al.* (2005). Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.
- Zhang, Y., Wolf, G. W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W. A. y Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902-8912.
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B. y Hung, M. C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J. y Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-2433.

